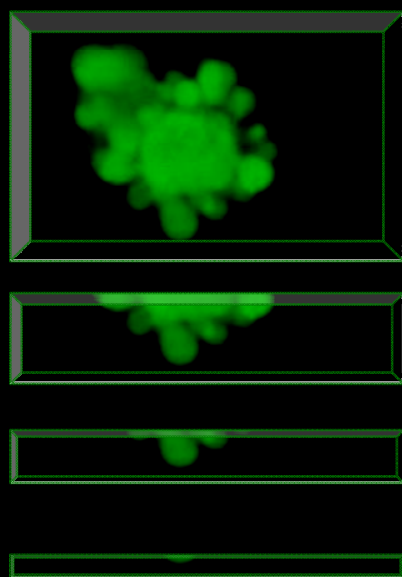


Universidade de Santiago de Compostela

Departamento de Fisioloxía 2008



Estudio de la respuesta celular a SOK1 y mecanismos de regulación

Tesis Doctoral

Emilio J. Nogueira Paz



FACULTADE DE MEDICINA

Departamento de Fisioloxía

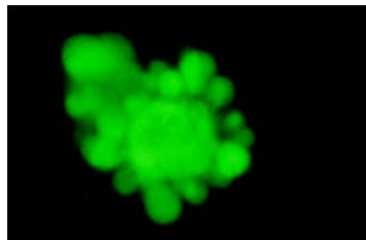
ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR A SOK1 Y MECANISMOS DE REGULACIÓN

Memoria del trabajo de investigación para optar al grado de Doctor
realizado por:

Emilio J. Nogueira Paz

Dirigido por:

Celia María Pombo Ramos



FOTOGRAFÍA PORTADA: célula perteneciente a un cultivo de células HeLa infectadas con adenovirus que expresan SOK1 y GFP clonadas en un vector de expresión bicistrónico.

La Dra. **CELIA MARÍA POMBO RAMOS**, profesora contratada doctora en el Departamento de Fisioloxía de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Estudio de la respuesta celular a SOK1 y mecanismos de regulación**” presentado por **D. Emilio J. Nogueira Paz**, para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisioloxía de la Universidad de Santiago de Compostela, y, considerando que cumple las condiciones necesarias, lo considera finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, Febrero del 2008.

Fdo.: Dra. Celia María Pombo Ramos

D. Emilio J. Nogueira Paz

A mi familia

*A mi hermana Nieves,
la persona de la que más he aprendido en la vida*

Llegado este momento, en que mi etapa de tesis llega a su fin, me gustaría agradecer...

En primer lugar, quiero dar las gracias Celia Pombo, directora de esta tesis, por confiar en mí y en mi escasa experiencia para por lo menos intentar sacar adelante este proyecto. Por permitirme adentrarme en el apasionante mundo de la biología y la señalización celular. Por darme la oportunidad para conocer el mundo de la investigación, y sobre todo por enseñarme como se trabaja en un laboratorio.

Gracias también a Chito por su gran implicación en este proyecto y en mi trabajo. Por su interés constante, su ayuda con innumerables subclonados, sus ideas a la hora de planificar experimentos y su colaboración a la hora de interpretar los resultados.

A Anxo y a Carmen, por estar siempre dispuestos a compartir los conocimientos que en muchas ocasiones solamente la experiencia puede aportar y por su opinión y ayuda con la discusión de los resultados. Gracias a Carlos Diéguez por aceptarme y cederme un sitio en su laboratorio en mi primera época como doctorando. Gracias a todos los grupos de investigación que forman parte del Departamento de Fisiología por permitirme compartir a lo largo de estos años algo tan valioso y casi siempre escaso como el espacio para trabajar y los equipos de trabajo.

Gracias a Thomas Force y John Kyriakis por generarnos el sistema de adenovirus y por las discusiones referentes a los resultados.

Gracias a mis compañeros de aventuras con SOK1. A Miguel, por ser un gran e incansable trabajador y por su ayuda compartiendo conmigo conocimientos y experiencia. A María, por su mano de obra en algún que otro experimento y sobre todo por hacerme reír cada día de trabajo que hemos compartido.

A Antía, mi primera compañera en el grupo de investigación, con la que empecé compartiendo mesa de trabajo y se ha convertido en una de mis mejores amigas. Gracias porque sin tu *verborrea despiadada* esto hubiera sido mucho más difícil.

Gracias a Edu, Rubén, Susana Bravo, Teresa... que tuvieron la difícil labor de instruirme e inculcarme mis primeras nociones de cómo desenvolverse en el laboratorio. Por no cansaros de repetirme día tras día dónde encontrar las cosas.

Además de los que ya he mencionado, como han sido tantas las personas con las que me he encontrado en estos años tanto en el laboratorio como fuera de él, y con las que he compartido tantas experiencias, me siento incapaz de elaborar una lista con todos los nombres y con los aspectos que tengo que agradecer a cada una de ellas. Además, me harían falta muchas páginas. Mejor englobar a todos en un gran agradecimiento colectivo. Espero que mucha gente vea su nombre reflejado en este párrafo, y aunque es difícil, que todos se lleven la parte de “gracias” que para mí se merecen. También es cierto, que para mí esta tesis estaría incompleta sin los nombres de otras pocas personas que aunque quizás de manera inconsciente han tenido mucho que ver en su realización. Gracias Martita, Isa (en la cresta de la ola), Vanesa, Luz, Óscar, gracias a mis arrítmicas

Agradecimientos

favoritas (Ruth y Pili), Eva, Miguel E., Claudia, Cristian, Jesús, Paqui, Gloria, Gonzalo y Pepe Pardo. A estos, y a todos los demás, gracias por la ayuda técnica, por compartir vuestra experiencia laboral conmigo, por dejarme *ese reactivo* que siempre se acaba en el peor momento. Gracias por los buenos momentos (y también los menos buenos) que hemos compartido dentro, fuera, o dentro y fuera de los límites del Departamento de Fisiología. Por innumerables conversaciones que hemos mantenido, por los ánimos, por hacerme reír, por estar dispuestos a escucharme y dispuestos también a ser escuchados.

Mila y Carmen, gracias por acogerme y cederme vuestra casa durante el primer año de esta aventura doctoral.

Gracias a *mis amigos del fin de semana*, aunque realmente sean amigos de casi toda, y espero que para toda la vida. Chazo, Reyes, María, Santi, Mari, Elena, Sara, Carni, Bebi, Rita, Michel, Monty y Alejandra. Gracias por lo mucho que me habéis ayudado en algunas ocasiones a olvidarme de *mis problemas celulares y moleculares*. Por vuestra ayuda, interés, apoyo y comprensión en todos los aspectos de mi vida. Gracias por seguir contando conmigo cada viernes/sábado/domingo para divertirse o para lo que haga falta. Quiero hacer extensivo el agradecimiento a todas las personas con las que he compartido momentos inolvidables durante 15 años en la Banda de Música Municipal de Ribadumia.

A mi familia. Mis padres, por tratarme siempre con la madurez adecuada para permitirme hacer en cada momento de mi vida lo que he creído más conveniente y respaldarme siempre. A mis hermanos, por mimarme y consentirme como a un auténtico hermano pequeño y por la tranquilidad que me proporciona saber que contaré con su apoyo haga lo que haga. A mis sobrinos, por despertar en mí cada día la ilusión y la alegría que solamente los niños pueden provocar. Por vuestras preguntas y por cada minuto de vuestras risas.

Gracias al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación del proyecto sobre el que se ha realizado esta tesis doctoral y a la Xunta de Galicia por concederme una Bolsa Predoctoral/Contrato María Barbeito.

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
I.-Las especies reactivas del oxígeno.....	5
1.-Antecedentes históricos.....	5
2.-Generación de ROS en los sistemas biológicos.....	7
3.-Antioxidantes. Mantenimiento del potencial de oxido-reducción.....	11
3.1.-Bacterias.....	12
3.2.-Levaduras.....	14
3.3.-Mamíferos.....	15
4.- Implicación de las especies reactivas del oxígeno en diferentes procesos fisiopatológicos y en el envejecimiento.....	18
4.1.- Daño por isquemia/reperfusión.....	18
4.2.- Enfermedades cardiovasculares.....	19
4.3.- Diabetes.....	20
4.4.- Desórdenes neurodegenerativos.....	21
4.4.1.- Enfermedad de Alzheimer.....	21
4.4.2.- Enfermedad de Parkinson.....	22
4.5.- Cáncer.....	23
4.6.-Envejecimiento.....	26
II.-Implicación de las ROS en procesos de señalización celular.....	27
1.- Formación de ROS tras la activación de receptores de membrana.....	28
2.- Efectos de las ROS sobre proteínas con actividad tirosina fosfata.....	30
3.- Efecto de las ROS sobre proteínas quinasa citoplasmáticas.....	31
3.1.-AKT.....	31
3.2.-Proteína quinasa C (PKC).....	32
3.3.-MAPKs.....	34
3.3.1.-ASK1.....	38
3.3.2.-Sustratos de las MAPK que median sus efectos biológicos.....	42
III.-El grupo de las proteínas Ste20. MAP4K.....	44
1.-Ste20p de levaduras.....	45

2.-Clasificación y funciones de las proteínas Ste20.....	45
2.1.-Subfamilia PAK-I.....	48
2.2. Subfamilia PAK-II.....	49
2.3.-Subfamilia GCK-I y GCK-IV.....	50
2.4.-Subfamilias GCK-II y GCK-III. Quinasas Mst.....	51
2.4.1.-Mst1.....	53
2.4.2.-Mst2.....	57
2.4.3.-Mst3.....	58
2.4.4.-Mst4/MASK.....	59
2.4.5.-SOK1/YSK1.....	60
2.5.-Subfamilia GCK-V.....	66
2.6.-Subfamilia GCK-VII.....	66
2.7.-Subfamilia GCK-VIII (familia TAO).....	66
IV.- Implicación del estrés oxidativo en la muerte celular.....	67
1.- Características bioquímicas de la apoptosis.....	71
1.1.- Ruta intrínseca.....	71
1.2.- Ruta extrínseca.....	72
OBJETIVOS.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1.-Plásmidos.....	81
2.-Traducción <i>in vitro</i> y análisis del corte de SOK1 por la caspasa 3.....	85
3.-Cultivos celulares.....	86
4.-Transfecciones e infecciones.....	89
5.-Obtención de extractos proteicos.....	92
6.-Análisis de los extractos proteicos.....	94
7.-Obtención y análisis de ARN.....	97
8.-Detección de citotoxicidad.....	99

9.-Análisis estadístico.....	99
RESULTADOS.....	101
1.-Caracterización de los efectos de SOK1 sobre la viabilidad celular.....	103
1.1.-La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte en diferentes líneas celulares.....	103
1.2.-Caracterización del tipo de muerte inducida por SOK1.....	106
1.3.-Implicación de SOK1 en la muerte inducida por diferentes tipos de estrés.....	108
1.3.1.-La inhibición de la expresión de SOK1 protege de la muerte en respuesta a anoxia química.....	109
1.3.2.-La inhibición de la expresión de SOK1 protege de la muerte en respuesta a estrés osmótico.....	111
1.3.3.-Caracterización del tipo de muerte frente al que protege la inhibición de SOK1	113
2.-Regulación de SOK1.....	114
2.1.-Caracterización de SOK1 como sustrato de la caspasa 3.....	115
2.2.-Búsqueda de nuevas proteínas que interaccionen con SOK1.....	118
2.2.1.-Mettl2a (<i>Methyltransferase like 2a</i>) y Mettl2b (<i>Methyltransferase like 2b</i>).....	121
2.2.2.-Estudio de la expresión de SINT-5 (Mettl2a) y Mettl2b mediante <i>northern blot</i>	122
2.2.3.-Caracterización de la interacción entre SOK1 y SINT-5 en células de mamífero.....	124
2.2.4.-SINT-5 disminuye la actividad quinasa de SOK1 y afecta a su movilidad en geles de poliacrilamida.....	126
2.2.5.-Efecto de SINT-5 y SINT5 ^{RVR} sobre la muerte celular inducida por SOK1.....	129
3.-Caracterización de los efectos de los dominios estructurales y bioquímicos (mutantes K49R, T174A y 4A) de SOK1 sobre la viabilidad celular.....	131
3.1.-Caracterización de los efectos de los dominios estructurales de SOK1 (RD y ΔC) sobre la viabilidad celular.....	131

3.2.-Caracterización de la influencia de la actividad quinasa de SOK1 y su hipotética señal de localización nuclear sobre la viabilidad celular.....	132
3.2.1.-Efecto de los mutantes K49R, T174A y 4A sobre la muerte inducida por SOK1.....	134
3.2.2.-Efecto de los mutantes K49R, T174A y 4A sobre la muerte inducida por Δ C-SOK1.....	135
 DISCUSIÓN.....	139
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159

2-DG	<i>2-Deoxyglucose</i> , 2-Deoxiglucosa
ADN	<i>Desoxiribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
ADNc	<i>Complementary desoxiribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , adenosina monofosfato cíclica
ARN	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
ASK1	<i>Apoptotic signal kinase 1</i> , quinasa de señal apoptótica 1
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , seroalbúmina bovina
CAT	<i>Catalase</i> , catalasa
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i> , fosfatasa intestinal de ternera
CN	<i>Sodium cyanide</i> , cianuro sódico
dCTP	<i>Desoxy citosine triphosphate</i> , desoxicitosina trifosfato
dNTPs	<i>Desoxy nucleotide triphosphate</i> , desoxinucleótidos trifosfato
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epitelial
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero bobino fetal
GCK	<i>Germinal center kinase</i> , quinasa del centro germinal
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
GMPc	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , guanosina monofosfato cíclica
GPx	<i>Glutation peroxidase</i> , glutacion peroxidasa
GSH	<i>Glutation</i> , Glutacion
GSSG	<i>Glutation disulfure</i> , glutacion disulfuro
IL-1	<i>Interleukin 1</i> , interleuquina 1
INF-γ	<i>Interferon-γ</i> , interferón- γ
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i> , lactato deshidrogenasa

Abreviaturas

MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	<i>MAPK/extracellular signal regulated kinase</i>
Mst	<i>Mammalian Ste20 like kinases</i>
NAD(P)H	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NES	<i>Nuclear export signal</i> , señal de exportación nuclear
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , señal de localización nuclear
PAK	<i>p21 activated kinase</i> , quinasas activadas por p21
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón salino fosfato
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	<i>Phosphoinositide 3- kinase</i> , fosfatidilinositol 3-quinasa
PKC	<i>Protein kinase C</i> , proteína quinasa C
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
PTP	<i>Protein tyrosine phosphatase</i> , proteína tirosina fosfatasa
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas del oxígeno
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> , receptor tirosina quinasa
SAPK	<i>Stress activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por estrés
SINT-5	<i>SOK1 interactor number 5</i>
sh-ARN	<i>Short hairpin RNA</i> , horquilla pequeña de ARN
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> , superóxido dismutasa
SOK1	<i>Ste20/oxidant stress response kinase</i>
T4 PNK	<i>T4 polynucleotide kinase</i> , T4 polinucleótido quinasa
TNF-α	<i>Tumoral necrosis factor α</i> , factor de necrosis tumoral α
Trx	<i>Tioredoxin</i> , tioredoxina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , factor de crecimiento vasoendotelial
XO	<i>Xanthine oxidase</i> , xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres, que en los sistemas biológicos están representados principalmente por las especies reactivas del nitrógeno (RNS) y las especies reactivas del oxígeno (ROS), se forman de manera espontánea como productos del metabolismo celular. Su cantidad o concentración debe mantenerse dentro de unos márgenes muy estrechos, ya que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. El control de su concentración es muy importante debido a que, normalmente a bajas o moderadas concentraciones, los radicales libres son beneficiosos para determinados procesos celulares, pero a concentraciones elevadas, lo que se conoce como estrés nitrosativo (aumento de las RNS) o estrés oxidativo (aumento de las ROS) pueden desencadenar daños irreparables en la célula. Para mantener en las células el equilibrio de los radicales libres y por lo tanto el potencial de oxido-reducción (concentración de electrones presentes en una célula) existe un conjunto de moléculas que se encarga de mantener sus niveles dentro de unos límites fisiológicamente adecuados, son los antioxidantes. Las respuestas por parte de la célula a los radicales libres se producen porque estos tienen la capacidad de alterar la actividad de numerosas rutas de señalización. La pérdida del equilibrio entre la formación y la eliminación de los radicales libres puede traer consecuencias graves tanto a nivel celular, como para todo un organismo. Una prueba de lo potencialmente peligrosas que son las estas moléculas derivadas del oxígeno, es el hecho de que el aumento de los radicales libres y la ruptura de la homeostasis del potencial de oxido-reducción de las células se sabe que está relacionada con numerosos procesos fisiopatológicos (revisado por Valco et al, 2007).

I. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

1. Antecedentes históricos.

El hecho de que el oxígeno puede tener efectos perjudiciales y nocivos para los organismos aeróbicos es algo que se conoce desde hace décadas. En 1954 Gerschman y colaboradores fueron los primeros en hablar de estos efectos perniciosos del oxígeno comparando su mecanismo de acción con el de otros agentes como los rayos-X (Gerschman et al., 1954). En el mismo año, se descubrió que los radicales libres están presentes en todos los materiales biológicos (Commoner et al., 1954) y en años posteriores se descubrió cuales podían ser los efectos de estos radicales libres así como

los procesos que los generan y también los mecanismos que regulan su concentración celular. Ya en esta época, concretamente en el año 1956 se propone por primera vez a los radicales libres como moléculas fundamentales o implicadas en el proceso de envejecimiento (Harman, 1956). Esto se pone de manifiesto en los numerosos trabajos publicados en la década de los 50 y 60. Es también en esta época cuando se empieza a demostrar la existencia de sustancias, actualmente bien estudiadas, consideradas antioxidantes, cuyo efecto es contrarrestar los daños producidos por las especies reactivas del oxígeno. Concretamente, en el trabajo de Gerschman y colaboradores, también se describe la reducción de los efectos negativos del oxígeno mediante tratamiento con sustancias reductoras como el beta-mercaptoetanolamina (Gershman et al., 1954) o en el trabajo de Gershenovichs y colaboradores donde hablan del papel protector de algunos aminoácidos como la arginina frente a los daños causados por el oxígeno (Gershenovichs et al., 1954).

Los estudios relacionados con las especies reactivas del oxígeno en los organismos vivos, entran en una nueva época adquiriendo mayor importancia e interés con el descubrimiento en el año 1969 de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (McCord et al., 1969). En este trabajo, además de verificar la existencia de forma natural de ROS en todos los organismos, muestra evidencias de la relevancia que pueden tener estas moléculas al comprobar que su producción está controlada enzimáticamente. Otro trabajo de gran importancia, en los estudios relacionados con éste campo, es el de Mittal y Murad (Mittal et al., 1977), en el que describen como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) puede actuar activando la guanilato ciclasa y estimulando la proliferación celular. De esta forma quedó demostrado que las ROS, además de existir de forma natural en las células, no solo suponen desventajas para éstas, si no que pueden activar diferentes rutas o mecanismos de señalización celular. Fue en este momento cuando empezó a comprobarse que las ROS y radicales libres en general, mantienen un papel dual en la biología de las células, por un lado suponen un peligro para la supervivencia si sus niveles son muy elevados, pero también son necesarios y forman parte de manera natural de determinadas rutas y de numerosos procesos metabólicos.

En la actualidad, el papel biológico de los radicales libres en general, y las ROS en particular, está mucho mejor caracterizado, siendo objeto de numerosos estudios y publicaciones que tienen como objetivo conocer totalmente el papel en los sistemas

biológicos de éste tipo de moléculas. La génesis de estos estudios estriba en el hecho de que se considera a los radicales libres como causa, o por lo menos implicados en numerosos procesos patológicos que suponen un gran coste para la sanidad y forman parte de la mayoría de los casos clínicos que día a día se tratan en los hospitales. Como ejemplo de estos procesos fisiopatológicos en que las ROS están implicadas, podemos citar, enfermedades cardiovasculares, daños por isquemia/reperfusión, procesos inflamatorios, evolución tumoral, enfermedades neurodegenerativas e incluso juegan un importante papel en el envejecimiento (revisado por Dröge et al, 2002; Valco et al, 2007).

2. Generación de ROS en los sistemas biológicos.

Los radicales libres se definen como moléculas que poseen uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales atómicos o moleculares (Halliwell et al., 1999). Los generados a partir del oxígeno (ROS) suponen el tipo más importante de radicales libres que existen en los seres vivos (Miller et al., 1990). Se forman con gran facilidad promovidos por las reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células debido a la estructura atómica de las moléculas de oxígeno (O_2). El oxígeno tiene una gran facilidad para quedarse con electrones desapareados en sus orbitales atómicos, lo que le proporciona una gran tendencia a reaccionar con otras moléculas para captar protones y obtener una configuración electrónica más estable.

La formación de lo que se denomina o se considera el primer radical originado a partir de una molécula de O_2 tiene lugar mayoritariamente en las mitocondrias (Cadenas et al., 1998) y es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se forma gracias a la ganancia de un electrón por parte de la molécula de O_2 (Miller et al, 1990). Esta reacción está catalizada por enzimas como la NAD(P)H oxidasa o la xantina oxidasa (XO), o por componentes no enzimáticos de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria como la semi-ubiquinona (**figura 1**). Las mitocondrias son la principal fuente de producción de energía en las células de mamíferos, concretamente, producen ATP mediante la cadena de transporte electrónico que tiene lugar a través de sus membranas. Durante este transporte, alguno de los electrones puede unirse prematuramente a una molécula de O_2 y así se origina el $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, estudios realizados sobre subpartículas mitocondriales revelan que solo aproximadamente el 5% de los electrones que

participan en la cadena de transporte sufren este proceso de unión prematura a una molécula de O_2 . La formación de $O_2^{\cdot-}$ tiene lugar tanto en el complejo I como en el III de la cadena de transporte de electrones, si bien, todo el anión superóxido que se forma en el complejo I pasa a la matriz mitocondrial y no se libera al citoplasma celular (Muller et al., 2004). Experimentos realizados sobre el complejo III determinan que parte del superóxido que se produce en este complejo sí que se libera de la mitocondria, pero se ha determinado que solamente el 50% de la producción total llega al citoplasma de la célula. A partir del anión superóxido, ya sea por reacciones catalizadas enzimáticamente o por metales de transición, pueden formarse otras ROS. Son las conocidas como especies reactivas del oxígeno secundarias.

El anión superóxido puede convertirse enzimáticamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a la enzima SOD (McCord et al., 1969), que a su vez puede dar lugar gracias a enzimas como la catalasa (CAT) o la glutatión-peroxidasa (GPX), a H_2O y O_2 quedando así neutralizada la formación de estos radicales.

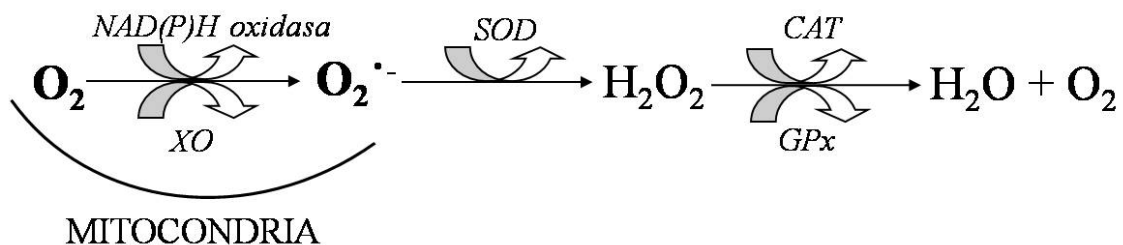
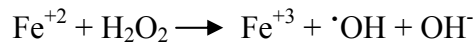


Figura 1.-Esquema de la producción y eliminación del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria.

Cuando en la célula aumentan demasiado los niveles de H_2O_2 , éste puede provocar la liberación de metales de transición, que normalmente se encuentran formando parte de complejos proteicos, como el hierro o el cobre. Estos metales de transición libres en el citoplasma de las células también pueden participar en la formación de más especies reactivas del oxígeno, ya que reaccionan con el H_2O_2 (reacción de Fenton) dando lugar al radical más reactivo de todos los posibles generados a partir del oxígeno, el radical hidroxilo (Leonard et al., 2004; Valco et al., 2005). El

radical hidroxilo presenta una vida media muy corta, de aproximadamente 10^{-9} segundos (Pastor et al., 2000), ya que puede reaccionar con cualquier estructura celular que se encuentre próxima a él en el momento de su formación provocando daños en estas estructuras.

Reacción de Fenton:



Bajo condiciones de estrés, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ favorece la producción de $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton ya que provoca la liberación de átomos de Fe^{+2} como resultado de la oxidación de complejos proteicos que poseen hierro.

Aunque la reacción de Fenton se sabe que tiene lugar *in vitro*, no está todavía muy claro su papel *in vivo* y en condiciones fisiológicas, ya que la mayoría de los metales que pueden dar lugar a esta reacción en la célula (hierro, cobre, cromo o cobalto) se encuentran unidos a estructuras proteicas que controlan de forma muy estricta la concentración de metales libres en la célula, y que por lo tanto impiden que puedan reaccionar formando más radicales libres (Kakhlon et al., 2002).

El radical hidroxilo también puede formarse mediante la reacción de Haber-Weiss a partir del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno (Liochev et al., 2002).

Reacción de Haber-Weiss:



Otro tipo de radicales derivados del oxígeno que se pueden formar en los sistemas biológicos son los radicales peroxilo (ROO^\cdot). El radical peroxilo más simple que existe se forma gracias a la ganancia de un protón por parte del anión superóxido, es el radical hidroperoxilo (HOO^\cdot) (De Gey et al., 2002). A partir del radical

hidroperoxilo, suele empezarse la ruta de peroxidación de lípidos, sobre todo lípidos de cadena insaturada.

Además de las mitocondrias, otro tipo de orgánulo celular que consume gran cantidad de oxígeno son los peroxisomas. Concretamente, son los orgánulos de la célula que más oxígeno consumen para llevar a cabo las reacciones metabólicas que en ellos tienen lugar. Sin embargo, en los peroxisomas no se produce $O_2^{\bullet-}$, aunque sí hay producción de H_2O_2 (Valko et al., 2004). El H_2O_2 producido en los peroxisomas es utilizado en distintas rutas metabólicas para oxidar diferentes moléculas. Para evitar que se acumule, estos orgánulos cuentan con concentraciones muy elevadas de catalasa. De esta manera, y en caso de que la célula no se encuentre sometida a estrés oxidativo que altere la estructura de sus membranas o la cantidad de enzimas implicada en el metabolismo del oxígeno, el H_2O_2 producido en los peroxisomas no se libera al citoplasma y no contribuye a la alteración del potencial de oxido-reducción celular.

En células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos, se pueden producir grandes cantidades de peróxido de hidrógeno y otras ROS gracias a la actividad de la enzima NADPH oxidasa, que en fagocitos presenta una isoforma diferente a la de las demás células. Esta producción de ROS supone la primera línea de defensa frente a infecciones por patógenos ambientales. La concentración de peróxido de hidrógeno en procesos inflamatorios puede llegar a ser de 10-100 μM . A esta producción de grandes concentraciones de ROS por parte de esta enzima se le denomina explosión oxidativa (*oxidative burst*). La importancia del papel fisiológico de la NADPH oxidasa en procesos inflamatorios se corrobora en estudios con ratones que no expresan alguno de los componentes de la enzima, (y por lo tanto esta no es funcional). Estos ratones son menos resistentes a infecciones (revisado por Droge et al, 2002). La NADPH oxidasa puede combinarse o actuar conjuntamente con la mieloperoxidasa y puede participar en la formación de hipoclorito (HOCl) en fagocitos. El hipoclorito es uno de los oxidantes más fuertes que existe y un potente antimicrobiano. Esto pone de manifiesto como las ROS no solamente influyen en la fisiología mediante la regulación de diferentes cascadas de señalización, sino que también están implicadas en la acción o funcionamiento del sistema inmunitario.

La activación de la NADPH oxidasa está controlada o depende sobre todo de proteínas de la familia Rac y puede desencadenarse en respuesta a productos del

metabolismo microbiano como lipopolisacáridos o lipoproteínas bacterianas, o bien en respuesta a citoquinas como el interferon- γ y varias interleuquinas (Thannickal et al, 2000).

3. Antioxidantes. Mantenimiento del potencial de oxido-reducción.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la producción de radicales libres es inherente al metabolismo celular. Estos radicales libres pueden provocar daños en numerosas estructuras celulares, pudiendo afectar estos daños a ácidos nucleicos, lípidos, y proteínas (Valco et al., 2006).

Por un lado, los radicales libres pueden reaccionar con los ácidos nucleicos, generando daños tanto en las bases nitrogenadas como en la cadena de desoxirribosas (Halliwell et al., 1999), actuando por lo tanto como una fuente de mutagénesis y carcinogénesis. Con respecto a los lípidos, los más susceptibles de ser oxidados por las ROS son los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos (Siems et al, 1995) dando lugar a la formación de radicales peroxilo. Estos radicales peroxilo pueden sufrir reacciones de ciclamiento y dar lugar a endoperóxidos, que son precursores del malondialdehído (MDA) (Fedtke et al., 1990; Fink et al., 1997; Mao et al., 1999; Marnett et al., 1999, Wang et al., 1996) y del 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), dos productos altamente mutagénicos y carcinogénicos. Con respecto a las proteínas, los residuos aminoácidos más susceptibles de ser oxidados son los residuos de cisteína y de metionina (Stadtman et al., 2004), provocando la formación de puentes disulfuro. La consecuencia de la alteración sufrida por las proteínas por parte de las ROS puede ser una pérdida, una ganancia, o incluso un cambio de función.

El potencial redox o potencial de oxido-reducción de una célula como ya se ha definido, es la concentración de electrones presentes en esa célula. Es específico o característico para cada tipo celular, y debe mantenerse dentro de unos parámetros muy estrictos, ya que por ejemplo, la variación de solamente 30 mV en el potencial de oxido-reducción de una célula, supone un incremento de 10 veces en la relación entre especies reductoras y especies oxidantes (Schafer et al, 2001). Para evitar que la producción de radicales libres altere su potencial de oxido-reducción, las células han tenido que desarrollar a lo largo de la evolución mecanismos de supervivencia frente al daño que

los radicales libres en general, y las ROS en particular les pueden proporcionar en caso de una producción o acumulación excesiva. Parte de este mecanismo de adaptación lo constituyen los antioxidantes, un grupo de moléculas tanto de naturaleza enzimática como no enzimática con capacidad para regular o controlar la cantidad de radicales libres que se acumulan en la célula. Esto les permite a las células mantener la concentración de radicales libres justa para que estos solo puedan llevar a cabo funciones no perjudiciales para ella, y que esta concentración no aumente pudiendo llegar a dañarla. Gracias a los antioxidantes, las células mantienen su potencial de oxido-reducción dentro de unos parámetros fisiológicamente adecuados para poder desempeñar correctamente su función dentro del organismo del que forman parte. Este potencial de oxido-reducción depende en última medida del equilibrio entre moléculas pro-oxidantes/antioxidantes. El mantenimiento de este equilibrio, lo que se conoce como homeostasis del potencial redox o proceso de regulación redox, protege a los seres vivos de los daños que el estrés oxidativo puede llegar a causar en ellos (Dröge et al., 2002).

Los antioxidantes pueden ser de naturaleza enzimática o de naturaleza no enzimática. Entre los de naturaleza enzimática se incluye la superóxido dismutasa, la CAT, y la GPx (**figura 1**). Como antioxidantes de naturaleza no enzimática destacan vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E); carotenoides, flavonoides y el glutathion (GSH).

Aunque los mecanismos para poder paliar los efectos negativos de las ROS y de los radicales libres en general ya aparecen en organismos inferiores como bacterias y levaduras, estos mecanismos suponen para los seres vivos una ventaja evolutiva. Es por este motivo que son más complejos en organismos más avanzados evolutivamente. Por lo tanto, el mayor nivel de complejidad se alcanza en mamíferos.

3.1 Bacterias.

En procariotas existen diferentes rutas que están implicadas en el mantenimiento del potencial de oxido-reducción de las células. De hecho, se sabe que niveles moderados de ROS en bacterias provocan el aumento de la concentración de enzimas con función antioxidante, como por ejemplo la Mn-SOD (Hassam et al., 1977), la CAT

(Yashpe-Purer Henis et al., 1977) o glutathion reductasa. Sin embargo en procariotas la mayor capacidad de protección frente al estrés oxidativo se encuentra bajo el control del *locus* OxyR. Se sabe que existen al menos nueve proteínas que se expresan bajo el control de este *locus* tras exposición a dosis letales de peróxido de hidrógeno o tras inducción de muerte por choque térmico (Bauer et al., 1999; Christman et al., 1985; Demple et al., 1983). El peróxido de hidrógeno o cambios en el equilibrio de los grupos tiol/disulfuro provocados por un desajuste del potencial de oxido-reducción intracelular promueven la formación de puentes disulfuro en la proteína reguladora OxyR, que pasa de su estado inactivo (reducida), estado en el que contiene grupos tiol (-SH), a su estado activo (oxidada), en el que los grupos tiol se transformaron en puentes disulfuro (S-S) (Aslund et al., 1999; Bauer et al., 1999; Storz et al., 1990; Zheng et al., 1998) (**figura 2**). Esto conlleva un cambio conformacional en la proteína de manera que la forma reducida y la oxidada pueden unirse a diferentes promotores del genoma bacteriano y controlar la expresión de diferentes genes que codifican proteínas implicadas en el mantenimiento de potencial redox de la célula. Cuando el potencial de oxidoreducción se restablece, los niveles de la proteína OxyR oxidada se reducen gracias a las enzimas glutarredoxina I y tiorredoxina (Trx) que rompen los puentes disulfuro formados como consecuencia del aumento del estrés oxidativo (Zheng et al., 1998).

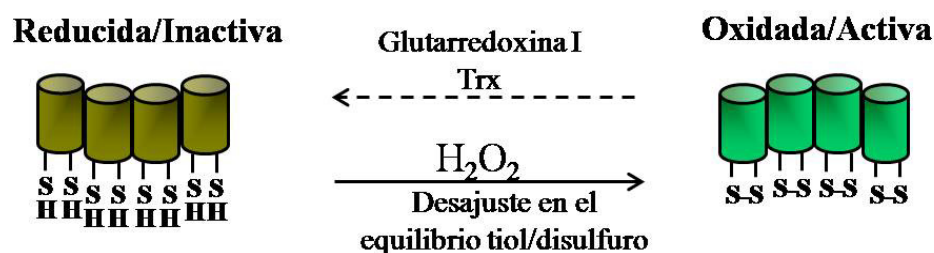


Figura 2.-Esquema de la activación/inactivación de la proteína reguladora del potencial de oxidoreducción de bacterias OxyR. Adaptado de Dröge, W. (2002). *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*.

En procariotas existen otros sistemas para la regulación del potencial de oxidoreducción celular, como por ejemplo la llevada a cabo por el *locus* sox. Este locus

controla la expresión de aproximadamente diez proteínas y su respuesta se desencadena sobre todo para proteger a la célula del anión superóxido (Hidalgo et al., 1995; Tsaneva et al., 1990). Aunque existen más, estos dos sistemas son los más estudiados y mejor conocidos en bacterias para el mantenimiento de la homeostasis del potencial redox en estos organismos.

3.2 Levaduras.

En levaduras, concretamente en *S. cerevisiae* se ha encontrado que en respuesta a 15 minutos de tratamiento con peróxido de hidrógeno, se incrementa la expresión de hasta 115 proteínas y se inhibe la expresión de 52 (Godon et al, 1998). Entre las proteínas cuya expresión se encuentra aumentada se encuentran por ejemplo la Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, CAT, glutathione reductasa, Trx reductasa, citocromo c peroxidasa y varias subunidades del proteasoma.

Además, en estos organismos se ha comprobado que en respuesta a estrés oxidativo se activa el factor de transcripción yAP-1 que promueve la transcripción de enzimas implicadas en el mantenimiento del potencial de oxido-reducción como la Trx (Kuge et al, 1994). La activación de yAP-1 tiene lugar a nivel postranscripcional. Una vez activada la proteína pasa a localizarse en el núcleo. Para la translocación al núcleo celular es importante una zona de la proteína próxima al extremo C-terminal rica en residuos de cisteína y por lo tanto sensibles a la variación del potencial redox (Kuge et al, 1997).

Otro factor de transcripción muy importante en levaduras y que también está implicado en la respuesta al estrés oxidativo es SKN7 (Morgan et al, 1997), que colabora con yAP-1 en el mantenimiento del potencial de oxido-reducción en este tipo de organismos.

Se han caracterizado otros factores de transcripción que regulan la respuesta a estrés oxidativo en levaduras. Es el caso por ejemplo del factor de transcripción Pap1. Este factor de transcripción se activa en respuesta a bajas concentraciones de H₂O₂ gracias a la formación de un puente disulfuro entre sus residuos de cisteína. Tras esta activación, Pap1 se acumula en el núcleo de la célula. Esta acumulación en el núcleo es suficiente para la activación constitutiva de su actividad transcripcional, y confiere a las células resistencia frente a diferentes tipos de drogas como la cafeína (Castillo et al,

2002). Recientemente, se ha caracterizado que la MAPK de levaduras Sty1, que forma parte de la principal ruta de respuesta a estrés en *S. pombe*, interviene en la regulación de Pap1 en respuesta a altas dosis de H_2O_2 , provocando su localización nuclear en estas condiciones (Vivancos et al, 2004). Sty1 regula la expresión de enzimas de naturaleza antioxidante. En respuesta a altas dosis de H_2O_2 , estas enzimas son las que se encargan de reducir el estado oxidativo de las células hasta el rango necesario para que se active Pap1. También se ha caracterizado que en la activación de Pap1 en respuesta a bajas dosis de H_2O_2 interviene la enzima peroxirredoxina (Prx) (Vivancos et al, 2005).

3.3 Mamíferos.

El control de la homeostasis del potencial de oxido-reducción en células de mamífero es más complejo. Hay muchas más moléculas implicadas y además hay casos de rutas específicas para cada tipo celular debido a que, gracias a la especialización de éstas, no todas se ven sometidas a la misma cantidad ni al mismo tipo de radicales libres.

Si bien es cierto que en mamíferos hay muchas moléculas implicadas, hay dos que destacan en el mantenimiento de la homeostasis del potencial redox intracelular. Son el GSH y la Trx.

Uno de los antioxidantes más estudiados en células de mamífero es el tripéptido glutathione (GSH). Interviene sobre todo, y es el más importante en el control del grado de oxidación de los grupos tiol (grado de oxidación/reducción de los átomos de azufre). Los átomos de azufre en los seres vivos se encuentran sobre todo en los residuos de cisteína. La forma oxidada del GSH es el glutathione disulfuro (GSSG) (Masella et al, 2005). Esta forma oxidada puede llegar a acumularse dentro de las células bajo condiciones muy elevadas o continuadas de estrés oxidativo, por eso la relación GSH/GSSG es un buen indicador del grado de estrés al que está sometido o que está sufriendo un organismo (Jones et al, 2000; Nogueira et al, 2004). Si la concentración de GSSG se incrementa demasiado, se forman puentes disulfuro inespecíficos entre diferentes proteínas que por lo tanto ven alterada su función. Si las condiciones de estrés no son demasiado elevadas ni prolongadas, los niveles de GSH se recuperan gracias a la enzima GSH reductasa.

Las principales acciones que lleva a cabo el GSH, implicadas en el mantenimiento del potencial redox, es actuar como cofactor de otras enzimas que también eliminan ROS como por ejemplo la glutatión peroxidasa (GPx), estar implicado en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, participar directamente en la eliminación radical hidroxilo y también participar en la detoxificación por peróxido de hidrógeno y por peroxidación de lípidos a través de la acción de la GPx. Además está implicado en la regeneración de los dos antioxidantes de naturaleza no enzimática más importantes, las vitaminas C y E (Masella et al, 2005). La capacidad del GSH para regenerar la mayoría de los antioxidantes está unida a su estado de oxidación/reducción (2GSH/GSSG) (Pastore et al, 2003).

El GSH es bastante abundante en la célula. Se encuentra en el citoplasma, en las mitocondrias y en el núcleo. De hecho, es el antioxidante soluble más abundante en estos compartimentos celulares. La presencia de GSH en el núcleo es muy importante porque controla el grado de oxidación de proteínas necesarias para la reparación y la replicación del ADN que poseen grupos sulfidrilos.

La Trx, la otra molécula de mayor importancia a la hora de mantener el equilibrio en el potencial de oxido-reducción en mamíferos, controla el grado de oxidación de los grupos tiol. La capacidad de la Trx para actuar como antioxidante viene determinada por la presencia de dos residuos de cisteína en su secuencia de aminoácidos (Cys32 y Cys35) que pueden encontrarse en estado reducido [Trx-(SH)₂] o bien oxidado (Trx-S₂). El encontrarse de una u otra forma depende del grado de estrés oxidativo presente en la célula. Una vez oxidada la Trx, promueve diferentes respuestas, como la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta a variaciones en el estado de oxidoreducción de la célula (como AP1 o NF-κB) (Nakamura et al, 1995; Nakamura et al 1997), o la activación de diferentes rutas de señalización celular (como la ruta de las MAPK).

Otro mecanismo utilizado por las células para eliminar el exceso de radicales libres reside en la capacidad que tienen algunas proteínas, sobre todo algunos aminoácidos para neutralizar estos radicales. Estas proteínas son susceptibles de ser oxidadas por las especies reactivas del oxígeno, captando así sus electrones desapareados responsables de su alta reactividad, para después ser eliminadas de la célula. La principal vía de eliminación de estas proteínas una vez han captado los

electrones desapareados de las moléculas de oxígeno es a través de la maquinaria proteasomal. Las proteínas una vez oxidadas son hasta diez veces más susceptibles de ser degradadas por esta vía que las proteínas intactas (Grune et al, 1996). Esto supone un mecanismo importante en la detoxificación de las ROS sobre todo porque las proteínas, péptidos o aminoácidos con esta capacidad se encuentran en la célula en concentraciones elevadas. Se ha comprobado que la proteólisis se encuentra aumentada en células que son sometidas a tratamiento con peróxido de hidrógeno entre 10-20 μM (Grune et al, 1997; Sulciner et al, 1997). También se ha comprobado que la inhibición del proteasoma provoca un aumento de la cantidad de ROS y de proteínas oxidadas presentes en las células. Este efecto se ve revertido cuando se añaden aminoácidos en el medio de cultivo.

Puede decirse, a modo de resumen, que el mantenimiento de la homeostasis del potencial redox en una célula en particular o en un organismo en general depende del equilibrio existente entre la concentración/formación de especies oxidantes y de la concentración/formación de especies reductoras con capacidad para neutralizar a estas moléculas oxidantes (**figura 3**). Como ya se ha mencionado anteriormente, este equilibrio es fundamental, no solo para que las ROS no se acumulen pudiendo dañar a la célula, sino también para que las especies reactivas del oxígeno se encuentren en su justa medida a la hora de actuar o desencadenar los numerosos procesos de señalización celular en los que participan.

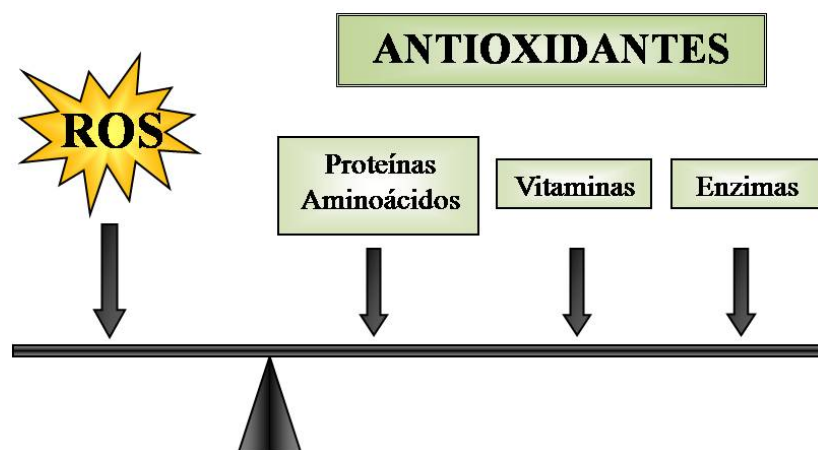


Figura 3.-Esquema del equilibrio existente entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los principales tipos de moléculas implicadas en su eliminación.

4. Implicación de las especies reactivas del oxígeno en diferentes procesos fisiopatológicos y en el envejecimiento.

La importancia o el interés de las investigaciones en el campo del estrés oxidativo radica en que las ROS, además de controlar determinadas funciones fisiológicas en humanos, están implicadas en numerosas enfermedades así como en el envejecimiento. Normalmente, los aspectos patológicos causados por las ROS están asociados a una elevada producción o elevada concentración celular. Estas situaciones patológicas suponen un gran problema de salud pública y enormes costes económicos a diario en todos los hospitales sobre todo en el mundo desarrollado. Algunos de estos problemas en los que están implicadas estas moléculas derivadas del oxígeno son daño por isquemia/reperfusión, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, y aunque no es una enfermedad, en el envejecimiento (revisado por Dröge et al, 2002; Valco et al, 2007).

4.1 Daño por isquemia/reperfusión.

El daño originado como consecuencia de la isquemia seguida de reperfusión es un proceso de gran relevancia clínica ya que pueden ser muchos y por diferentes motivos los órganos o tejidos que se ven privados de aporte sanguíneo durante algún tiempo seguido de un restablecimiento de la circulación sanguínea. Ya durante la isquemia, pero sobre todo durante la reperfusión, se generan gran cantidad de especies reactivas del oxígeno, principalmente en la mitocondria. Esto supone un grave problema a la hora de hacer trasplantes de órganos, en ataques cardíacos o infartos de miocardio (Kasparova et al, 2005). En estos tejidos, y a pesar de que el tejido cardíaco cuenta con mecanismos de protección que lo preconditionan frente a un hipotético caso de isquemia, que consiste en una elevada concentración de sustancias de naturaleza antioxidante, las especies reactivas del oxígeno pueden provocar apoptosis. Como consecuencia de la apoptosis pueden producirse arritmias, infarto de miocardio, etc.

Estudios realizados en corazón de rata demostraron que los daños producidos por los procesos de isquemia/reperfusión provocan la activación de las rutas de las MAPK, sobre todo de JNK y p38 (ERK en menor medida) y la activación de factores de transcripción sensibles al potencial de oxido-reducción como NF- κ B y AP-1. Se ha

demostrado en este mismo modelo que la SOD es capaz de minimizar levemente los daños producidos por este tipo de procesos (Lazou et al, 1994).

También se realizaron estudios farmacológicos para investigar los problemas causados por el estrés oxidativo generado como consecuencia de este tipo de procesos (Chen et al, 1998). Otro tipo de estudios utiliza ratones modificados genéticamente para ver el efecto de la sobreexpresión o inhibición de diferentes enzimas implicados en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Jones et al, 2003).

4.2 Enfermedades cardiovasculares.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo en miocitos cardíacos y vasculares está relacionado con diversas enfermedades cardiovasculares. Se ha comprobado que en el tejido cardíaco, las especies reactivas del oxígeno están asociadas con daños o modificaciones en el estado de oxidación de grupos tiol de las proteínas y con la peroxidación de fosfolípidos. Esto provoca alteración en el funcionamiento de las proteínas celulares así como daños en la estructura de las membranas lipídicas que afectan a su permeabilidad (Molavi et al, 2004). Además de afectar a la funcionalidad de las proteínas y a la estructura de las membranas, las ROS también afectan a los orgánulos celulares provocando alteraciones funcionales en los miocitos que están sometidos a estrés oxidativo.

El aumento de los niveles de calcio en los miocitos tiene un importante papel en su disfunción. Este aumento del calcio se produce porque tanto el anión superóxido como el radical hidroxilo provocan su liberación del retículo sarcoplasmático, como consecuencia de la alteración de las proteínas que están implicadas en su transporte. Además de todos estos procesos, la reperfusión provoca la entrada de calcio extracelular en el miocardio. Los elevados niveles de calcio junto con las especies reactivas del oxígeno, son la causa de problemas cardiovasculares como la aterosclerosis, hipertensión, hipertrofia cardíaca, etc. (Kukreja, 1992).

4.3 Diabetes.

Solamente el 10% de los pacientes con diabetes son incapaces de producir insulina (*diabetes mellitus* tipo I o diabetes insulino dependiente) (Brownlee, 1981; Nedowicz, 2005). El resto de pacientes con esta enfermedad, sí que pueden producir insulina pero sus células son resistentes a ella (*diabetes mellitus* tipo II o diabetes no insulino dependiente) (revisado por Nishikawa et al, 2007). La incapacidad de asimilar glucosa por parte del tejido adiposo y del músculo provoca en este tipo de pacientes una hiperglucemia crónica que genera daños en diferentes tejidos así como diversas complicaciones fisiopatológicas como enfermedades cardíacas, aterosclerosis, cataratas, retinopatías, daño en los nervios periféricos, etc. (Brownlee, 1981). La hiperglucemia en un organismo provoca un aumento en las especies reactivas del oxígeno a través de diferentes mecanismos. El aumento del estrés oxidativo se considera una de las principales causas de los problemas derivados de la hiperglucemia en pacientes diabéticos.

Las fuentes de las especies reactivas del oxígeno en pacientes con diabetes son varias. Por un lado está la mitocondria, que normalmente forma superóxido en los complejos I y III de la membrana mitocondrial. Se ha podido comprobar que en condiciones de hiperglucemia, además de estos dos complejos, el complejo II se convierte en la principal fuente de anión superóxido. Otra fuente de ROS en diabéticos es la NAD(P)H oxidasa, que genera especies reactivas del oxígeno sobre todo en tejido vascular y en las células del riñón. Su implicación en la formación de ROS en otros tejidos no ha podido demostrarse. La producción de ROS por parte de la NAD(P)H oxidasa puede bloquearse por diferentes inhibidores de la proteína PKC, lo que significa que ésta posee un papel en la generación de ROS por parte de la NAD(P)H en diabéticos.

El hecho de que el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia también tenga lugar en eritrocitos que no poseen mitocondrias ni NAD(P)H oxidasa, indica que tiene que haber en estas células otro mecanismo que posibilite la formación de ROS. Hay evidencias *in vitro* de que este mecanismo puede tener que ver con la auto-oxidación de la glucosa, (Robertson et al, 2003) ya que tanto ésta como varios productos derivados de su metabolismo pueden reaccionar con el peróxido de hidrógeno en presencia de hierro y cobre dando lugar a la formación del radical hidroxilo.

Otras enzimas cuya implicación se ha demostrado en la formación de ROS en condiciones hiperglucémicas son la XO, que parece tener un efecto tejido-específico o la lipooxigenasa.

La hiperglucemia existente en los pacientes con diabetes tipo II se crea como consecuencia de la resistencia a la insulina de las células. Como se ha explicado anteriormente esto conduce a la formación de especies reactivas del oxígeno. Las células responsables de producir la insulina son las células β del páncreas. Estas células poseen cantidades anormalmente bajas de enzimas antioxidantes. Se cree que una de las causas principales para que estas células dejen de ser funcionales en pacientes con diabetes tipo II es el daño que las elevadas concentraciones de especies reactivas del oxígeno provocan en ellas, daño que por otra parte no pueden minimizar o reducir debido a su escasa concentración de antioxidantes. Por este motivo, la terapia con antioxidantes en pacientes con diabetes parece preservar durante más tiempo la funcionalidad y reducir la apoptosis de las células β pancreáticas.

4.4. Desórdenes neurodegenerativos.

El cerebro utiliza en su metabolismo una gran cantidad de compuestos que poseen oxígeno. Esto, junto con su gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados susceptibles de ser oxidados y la presencia en él de metales como el cobre o el hierro que pueden participar en reacciones que generan ROS, lo hacen especialmente vulnerable a sufrir daños por parte del estrés oxidativo. Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo aumenta con la edad de los individuos, es lógico que esté relacionado con enfermedades que suelen manifestarse en personas de edad avanzada.

4.4.1 Enfermedad de Alzheimer. El cerebro de las personas con enfermedad de Alzheimer muestra daños relacionados con estrés oxidativo que en este tipo de pacientes se traducen en la acumulación del péptido β -amiloide. Este péptido es el mayor componente de las placas seniles que se forman en el cerebro de personas con enfermedad de Alzheimer. El péptido β -amiloide es un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos que se forma como consecuencia de la rotura proteolítica de una proteína precursora de mayor tamaño.

Los factores neuroquímicos responsables de esta acumulación de péptido β -amiloide dependiente de la edad no están totalmente esclarecidos, sin embargo, cada vez se considera que los metales como el hierro (Fe), el cobre (Cu) o el zinc (Zn) juegan un papel relevante en la formación de las placas seniles y procesos de degeneración neuronal.

El péptido β -amiloide puede unirse a estos tres metales, aunque presenta una mayor afinidad por el Cobre. Para que se produzca esta reacción de unión del β -amiloide al Cu es necesaria una reducción de este metal de su estado Cu^{+2} a Cu^{+} , con lo cual durante esta unión pueden generarse peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo a través de la oxidación del ascorbato (Dikalov et al, 2004), o pueden oxidarse residuos de metionina dando lugar a radicales libres del azufre. Por lo tanto, la unión del β -amiloide con los átomos de Cu genera radicales libres y pueden ser una de las causas de la patogenicidad en la enfermedad de Alzheimer.

4.4.2 Enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson está causada por la pérdida selectiva de neuronas de una zona del cerebro denominada sustancia negra (Sayre et al, 2001). Las neuronas de la sustancia negra se comunican a través del neurotransmisor dopamina con las neuronas de otra zona denominada *stratium*. Parece ser que los síntomas de la enfermedad de Parkinson están causados por una disminución de los niveles de dopamina en el *stratium* (Jenner, 2003). Además de la pérdida de neuronas de la sustancia negra, el cerebro de los enfermos de Parkinson se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy, que son depósitos de una proteína (α -sinucleína) que se encuentran en el interior de las células nerviosas en cortex, tálamo anterior, amígdala e hipotálamo. Estos acúmunos alteran el funcionamiento del cerebro, ya que impiden la acción de neurotransmisores importantes como la dopamina y la acetilcolina. Se consideran como la causa genética de la enfermedad de Parkinson dos mutaciones descubiertas recientemente en la α -sinucleína (Jin et al, 2006).

La consideración del estrés oxidativo como implicado en la enfermedad de Parkinson se basa en estudios *postmortem* de pacientes y en estudios que demuestran la capacidad del estrés oxidativo para provocar la degeneración de las neuronas de la sustancia negra. Se sabe que el estrés oxidativo basal en la sustancia negra es elevado, pero este aumenta en pacientes con enfermedad de Parkinson, aunque también se

encontraron en estos pacientes otros factores como inflamación, óxido nítrico y disfunción de las mitocondrias. Se cree que todos estos factores están implicados en la etiología de la enfermedad (Andersen, 2004).

En los últimos años se ha incrementado la creencia de que la ruta de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) puede tener un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad. Esto es debido a que se ha comprobado que esta ruta tiene un papel importante a la hora de regular procesos celulares que están afectados en la enfermedad de Parkinson (Peng, 2003).

Uno de los primeros eventos detectables en las neuronas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson es una disminución de los niveles de GSH. En células dopaminérgicas en cultivo, se comprobó que el descenso de los niveles de GSH provoca un descenso en la actividad del complejo I de la mitocondria, así como una pérdida de función por parte de estos orgánulos, algo que también se observa en enfermos de Parkinson. Hay evidencias que indican que los desajustes en el complejo I de la mitocondria son los responsables de la acumulación de α -sinucleína. Los daños en el complejo I parecen estar relacionados con un aumento de las RNS. También se ha demostrado que el hierro tiene un papel en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Kaur et al, 2003).

4.5 Cáncer.

El estrés oxidativo provoca cambios en el potencial de oxido-reducción que genera alteraciones presentes en las células de diferentes tumores y no en células normales. Exposiciones prolongadas al estrés oxidativo provocan mutaciones en el ADN de las células que se consideran la principal causa de mutagénesis y por lo tanto de desarrollo tumoral. Se han identificado en diferentes tumores más de 100 mutaciones en el ADN que están provocadas por estrés oxidativo. Estas mutaciones alteran la expresión de diferentes genes que pueden conducir a la carcinogénesis (Marnett 2000; Valco et al, 2006).

Además de las ROS, también se han identificado diferentes metales con capacidad de promover la generación de radicales libres, implicados en el proceso de carcinogénesis.

Hay más compuestos que pueden influir en el proceso de carcinogénesis ya sea favoreciendo la aparición de ROS o actuando como co-carcinógenos. Este es el caso de los compuestos del arsénico, que aunque no es capaz de generar ROS sí que puede modificar o inactivar enzimas antioxidantes provocando la oxidación de sus átomos de azufre, como es el caso de la glutathione reductase (Roy et al, 2002). Otros factores que pueden dañar los ácidos nucleicos variando la concentración de ROS son metales como el cadmio, fumar, el ejercicio físico o la dieta.

No solo los daños en el ADN nuclear están relacionados con el proceso de carcinogénesis, sino que también se ha encontrado que los daños en el ADN mitocondrial pueden tener un papel importante en este proceso.

Además de los daños en el ADN, se ha comprobado que los daños en los lípidos también están relacionados con el proceso de carcinogénesis. De hecho, hay dos productos generados como consecuencia de la peroxidación de lípidos altamente implicados en el desarrollo y progresión tumoral, son el malondialdehído (MDA), que es mutagénico en bacterias y en células de mamífero y carcinogénico en ratas (Marnett, 1999), y el 4-hidroxi 2-nonenal (HNE).

Las especies reactivas del oxígeno juegan un importante papel en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral no solamente causando daños en el ADN o en lípidos, si no también modificando o alterando el funcionamiento de rutas de señalización celular. Pueden citarse como ejemplo de mecanismos de señalización celular susceptibles de ser alterados por las especies reactivas del oxígeno diferentes receptores para factores de crecimiento (EGF, PDGF, VGF), o factores de transcripción como AP-1, NF- κ B, o p53. Los mecanismos en los que están envueltas todas estas moléculas controlan aspectos tan fundamentales e importantes para el desarrollo y progresión tumoral como el crecimiento, la división o la muerte celular. Por eso, al verse alteradas sus funciones como consecuencia de las especies reactivas del oxígeno pueden promover la formación de nuevos tumores o afectar a su evolución.

Los antioxidantes son moléculas que no sólo reducen la cantidad de radicales libres, sino que también participan en la regulación de procesos celulares como la regulación del ciclo celular, inhibición de proliferación e inducción de apoptosis, disminución de respuestas inflamatorias, etc. Por este motivo también juegan un papel importante en el desarrollo tumoral. De hecho, algunas enzimas de naturaleza

antioxidante como la MnSOD se han considerado como posibles supresores de tumores (Behrend et al, 2003).

Hay varios estudios que relacionan las concentraciones de otros antioxidantes como el GSH o la Trx con diversos tipos de tumores (revisado por Valco et al, 2007).

Para contrarrestar el elevado estrés oxidativo existente en las células tumorales en algunos casos se han administrado antioxidantes como terapia a enfermos con cáncer. Sin embargo esto debe hacerse con mucho cuidado y teniendo en cuenta el estado de evolución del tumor, ya que reducir con antioxidantes la concentración de especies reactivas presentes en las células también puede hacer disminuir la tasa de apoptosis de éstas.

Un proceso fundamental que posibilita el crecimiento tumoral es la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis que aporten oxígeno al tumor (Folkman, 1995). La angiogénesis es un proceso que consta de numerosos pasos en cuyo control se sabe desde hace tiempo que está implicado el factor de transcripción y supresor de tumores p53. Con el descubrimiento de nuevos miembros de la familia, p63 y p73, se pudo comprobar que todos están implicados en el proceso de angiogénesis, dificultando todavía más su comprensión (Carmetiet et al, 2000). La angiogénesis y el desarrollo de metástasis son procesos que están estrechamente relacionados. Para la invasión de las células cancerígenas es necesaria la remodelación de la matriz extracelular (Westermarck et al, 1999). Aunque esta remodelación es un proceso que tiene lugar también en condiciones fisiológicas normales, está estrechamente ligado a la invasión de tejidos por las células tumorales. En el proceso de remodelación de la matriz extracelular intervienen varias proteasas, las más importantes son un grupo de metaloproteinasas dependientes de zinc, (Nagase et al, 2003). Estas metaloproteinasas son fundamentales para muchos procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, pero también están asociadas con procesos patológicos, no solo con la invasión celular y metástasis si no que también están implicadas en procesos como la artritis reumatoide (Galis et al, 2002).

4.6 Envejecimiento.

El proceso de envejecimiento puede definirse como la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas que sufren los individuos después de la fase reproductora (revisado por Valco et al, 2007).

Hay dos teorías principales que intentan explicar el envejecimiento, la teoría del daño acumulado (Harman, 1998) y la teoría genética (Fossel, 2003). Dentro de la teoría del daño acumulado se encuentra la teoría de los radicales libres, y sostiene que el envejecimiento se debe entre otras causas a la acumulación de los daños aleatorios que los radicales libres producen sobre el ADN, los lípidos y las proteínas en los organismos aeróbicos.

También según la teoría del daño acumulado, el principio del envejecimiento empieza con el oxígeno y los radicales que se forman a partir de él sobre todo en la mitocondria. El primer lugar dónde estos radicales pueden causar daños es el ADN mitocondrial (Cadenas et al, 2000), que además, a diferencia del ADN nuclear no es reparado eficientemente. Por lo tanto, el ADN mitocondrial va acumulando daños que provocan un peor funcionamiento de las mitocondrias y como consecuencia la muerte celular.

En el año 1999 el grupo de Halliwell y colaboradores publicaron un trabajo que relaciona directamente el consumo de oxígeno por parte de los diferentes organismos con el tiempo que estos pueden vivir, demostrando que a mayores tasas metabólicas, o mayor consumo de oxígeno, más rápido se produce el envejecimiento del organismo y por lo tanto menor es su tiempo o esperanza de vida (Halliwell et al, 1999).

En humanos, el nivel de daño en el ADN por estrés oxidativo puede medirse a través de moléculas presentes en la orina. Estos marcadores varían no solo en función de la edad, sino también en función de la restricción calórica y de la dieta en general. Por lo tanto, la longevidad no depende solamente de la tasa de consumo de oxígeno sino también de la composición de la dieta (revisado por Valco et al, 2007).

Estudios con otros tipos de moléculas marcadoras del daño en el ADN indican que la capacidad de reparar el ADN en un organismo depende de la edad, y además comparando esta capacidad entre diferentes especies se ve que las especies con una mayor esperanza de vida tienen esta capacidad más elevada (Barnett et al, 1995).

Además de los daños en el ADN, los daños en las proteínas se cree que también tienen importancia en el proceso de envejecimiento. En este sentido se comprobó que enzimas aisladas de individuos jóvenes son catalíticamente más activas y más estables a temperatura que las mismas enzimas obtenidas de individuos de mayor edad (Stadtman, 2004). La telomerasa, una enzima implicada en el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas y que juega un importante papel en la evolución de diferentes tumores, ha sido directamente relacionada con el envejecimiento (Saretzki et al, 2002). Esta menor funcionalidad en las enzimas a medida que envejecen los individuos, se justifica según la teoría del daño acumulado (Harman, 1998) por los daños que los radicales libres que se generan en los organismos aeróbicos provocan en el ADN y en las proteínas.

II. IMPLICACIÓN DE LAS ROS EN PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR.

La necesidad de comunicación entre las diferentes células que forman los seres vivos es un hecho obvio y estrictamente necesario para que cada una pueda llevar a cabo correctamente su función como parte de un organismo completo. A estos mecanismos de comunicación entre las diferentes células se les denomina procesos de comunicación o señalización celular, y son más necesarios y complejos a medida que avanzamos la escala evolutiva de los seres vivos. La señalización celular sirve para transmitir información de unas células a otras y para que esta información pase del exterior a los diferentes elementos funcionales que se encuentran dentro de las células para provocar una determinada respuesta. (Poli et al, 2004). Las moléculas extracelulares implicadas en la transmisión de señales pueden ser hormonas, factores de crecimiento, citoquinas o neurotransmisores. Las células receptoras de la información integran la señal de manera que la transmiten a su interior lo que suele provocar la activación de moléculas denominadas factores de transcripción que se desplazan al núcleo celular donde promueven la expresión de determinados genes por unión a promotores específicos existentes en el ADN. El resultado de estos mecanismos de señalización puede traducirse en diferentes actividades biológicas como fosforilación de proteínas, expresión de genes que llevan a respuestas como la división celular, transmisión de señales nerviosas, o contracción muscular (Thannickal et al, 2000).

Aunque las ROS son en general más conocidas por provocar daños celulares, también tienen un importante papel fisiológico como moléculas que participan en la señalización celular dentro de un contexto fisiológico (Döge, 2002). De hecho, se sabe que además de células fagocíticas, existen muchos otros tipos celulares que son capaces de generar pequeñas concentraciones de ROS gracias a la activación tras la unión de diferentes ligandos a distintos tipos de receptores situados en la membrana plasmática de la célula. Una vez que se generan estas ROS actúan como segundos mensajeros en procesos de señalización celular (Storz, 2005). Los estímulos que provocan el aumento de la concentración de ROS tras su unión específica a sus receptores de membrana son sobre todo citoquinas y factores de crecimiento (Thannickal et al, 2000). Probablemente el efecto más importante de las ROS como moléculas de señalización celular, tenga lugar modulando la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) (Sun et al, 1996).

1 Formación de ROS tras la activación de receptores de membrana.

Se han caracterizado diferentes factores de crecimiento que provocan la generación de ROS tras su unión a receptores específicos de membrana. Los receptores a los que se unen los factores de crecimiento son sobre todo del tipo tirosina quinasa (RTKs). Como consecuencia de la activación del receptor se activa la NAD(P)H oxidasa a través de la proteína Rac1, generando sobre todo superóxido y peróxido de hidrógeno. Esto es muy similar a lo que ocurre en la explosión oxidativa de las células fagocíticas, pero cuantitativamente la cantidad de ROS producida por la NAD(P)H en células no fagocíticas es menor. El peróxido de hidrógeno favorece la autofosforilación del receptor que inicia la cascada de señalización. Estos receptores transmiten la información entre otras a través de la vía de las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) (Mulder, 2000). Esta información puede tener diferentes efectos sobre la biología celular. Se han encontrado casos donde se favorece la proliferación, la diferenciación, o la apoptosis. En otros casos la estimulación de este tipo de receptores por factores de crecimiento inhibe la formación de peróxido de hidrógeno y esto posee normalmente un efecto neuroprotector.

Puede decirse por lo tanto, que los factores de crecimiento, a través de la producción de ROS pueden tener efectos específicos de tejido al igual que a través de

otras moléculas. Receptores de tipo tirosina quinasa implicados en la producción de ROS en respuesta a factores de crecimiento son el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGF), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Neufeld et al, 1999). Se ha detectado la existencia de otro tipo de receptores que colabora sinérgicamente con estos receptores de factores de crecimiento. Un ejemplo es el receptor de la angiotensina II, perteneciente a la familia de receptores acoplados a la activación de proteínas G. Una vez activado este receptor, provoca la activación de la NAD(P)H oxidasa a través de Rac1, y genera la producción de peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno provoca la transactivación por autofosforilación de los receptores de factores de crecimiento, como por ejemplo los receptores de EGF o PDGF.

Los receptores implicados en integrar la señal para la producción de ROS en las células en respuesta a citoquinas e interleuquinas son un grupo más heterogéneo. Son receptores que en muchos casos han perdido su actividad quinasa intrínseca y que normalmente modifican la actividad de canales iónicos o que están asociados a proteínas G heterotriméricas. Las ROS generadas como consecuencia de la unión de citoquinas e interleuquinas a este tipo de receptores actúan como segundos mensajeros regulando procesos celulares como la proliferación o la muerte. No está totalmente claro todavía, o no existe consenso con respecto al tipo de radicales generados, el lugar donde se generan o las enzimas implicadas en la síntesis de ROS en respuesta a citoquinas. Las primeras citoquinas e interleuquinas que se describió que actúan de este modo, provocando la formación de especies reactivas del oxígeno en células no fagocíticas, son el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 1 (IL-1) o el interferón γ (INF- γ) (Chapple et al, 1997).

Existen otros tipos de receptores cuya activación también promueve el incremento de la cantidad de ROS intracelular. Son por ejemplo los receptores con actividad serina/treonina quinasa, cuyos miembros pertenecen todos a la superfamilia del TGF- β y cuya activación provoca el aumento del estado de oxidación celular tanto generando peróxido de hidrógeno como inhibiendo la síntesis de enzimas como la CAT o la SOD. Este aumento del estado de oxidación celular parece mediar determinados efectos mediados por la activación de estos receptores, como la inhibición del crecimiento celular, apoptosis, transformación, síntesis de colágeno o autoactivación del propio receptor.

Otro tipo de receptores que media la producción de ROS en las células son los receptores asociados a la actividad de proteínas G heterotriméricas. Esta es la familia más extensa de receptores de membrana que existe en mamíferos, ya que incluye más de 100 miembros. Entre los ligandos que se unen a receptores de esta familia y que favorecen la formación de ROS en distintos sistemas celulares destacan la angiotensina II, la serotonina, la trombina, la bradiquinina o la endotelina. También existen procesos de señalización celular mediados por ROS en respuesta a la activación de receptores asociados a canales iónicos. Esto tiene lugar en células excitables eléctricamente y se conoce menos sobre la generación de ROS en respuesta a la activación de estos receptores que en el caso de los receptores descritos previamente (revisado por Thannickal et al, 2000).

2 Efectos de las ROS sobre proteínas con actividad tirosina fosfatasa.

Todas las proteínas con actividad tirosina fosfatasa (PTPs) pueden ser inactivadas de forma reversible por un aumento en los niveles de ROS intracelulares. Todas tienen una estructura conservada que incluye un residuo de cisteína en su centro activo (Bardford et al, 1995). En caso de que las células se sometan a concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno (aproximadamente 1 mM) o en caso de verse alterado el equilibrio existente en los grupos tiol/disulfuro en la célula, el azufre de este residuo de cisteína se oxida (cys-SOH), de forma que la proteína forma dímeros y deja de ser activa (Salmeen et al, 1995). Esta oxidación puede tener lugar por interacción directa con el peróxido de hidrógeno, o bien por interacción con la forma oxidada del glutatión (GSSG), dando como resultado la glutatiónización del residuo de cisteína. De esta forma se rompe el equilibrio entre la actividad de fosfatasas y quinasas existente en la célula. Si como consecuencia del incremento de las ROS las fosfatasas dejan de ser activas, y por otro lado se favorece la activación por fosforilación en los residuos de tirosina de las proteínas quinasa, este desequilibrio existente entre la actividad de las fosfatasas y las quinasas es clave a la hora de obtener una respuesta celular al estímulo que lo provoca. Por ejemplo, el receptor de EGF, que suele ser defosforilado en menos de un minuto tras la unión del ligando, tarda mucho más en ser inactivado cuando las células se ven sometidas a tratamiento con peróxido de hidrógeno o cuando se incrementan los niveles de ROS intracelulares (Knebel et al, 1996).

En condiciones fisiológicas, los efectos de la inhibición de la actividad de las fosfatasa por oxidación del residuo de cisteína de su centro activo, suelen ser revertidos gracias a los elevados niveles de GSH que normalmente existen en las células.

3. Efecto de las ROS sobre proteínas quinasa citoplasmáticas.

Como ya se ha nombrado, el efecto de las especies reactivas del oxígeno sobre las fosfatasa es inhibitorio. Sobre las proteínas con actividad quinasa el efecto es el contrario, ya que favorecen la fosforilación sobre todo de sus residuos de tirosina. Es por este motivo que existen numerosas quinasas citoplasmáticas cuya actividad es incrementada por un aumento de las ROS o por un desplazamiento o rotura del equilibrio del potencial de oxido-reducción de la célula.

3.1 Akt.

Un ejemplo de quinasa que se activa en respuesta al aumento de la concentración de especies reactivas del oxígeno es Akt. Akt es una serina/treonina kinasa que en mamíferos presenta 3 isoformas (Akt1, Akt2 y Akt3). Su activación media procesos de supervivencia celular dependiendo de sus niveles de expresión en la célula, del tipo celular y del tipo e intensidad del estímulo que provoque su activación. Por el contrario, la inhibición de Akt provoca apoptosis. La activación de Akt tiene lugar sobre todo en situaciones fisiopatológicas donde las ROS aumentan como consecuencia de procesos de isquemia/reperfusión, jugando un papel importante en la protección de diferentes tipos de células o tejidos sometidos a este proceso. Es el caso por ejemplo del tejido nervioso, tejido cardíaco, tejido hepático o cuando los procesos de isquemia/reperfusión tienen lugar como consecuencia de traumas o hemorragias severas (revisado por Mullonkal et al, 2007).

Para la activación de Akt es necesario que sea reclutada del citoplasma a la membrana plásmica a través del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que interacciona con su dominio N-terminal y además debe fosforilarse en los residuos de Thr384 y de Ser473 (Hui et al, 2005; Vivanco et al, 2002). Una vez activada, Akt se libera de la membrana y vuelve a localizarse en el citoplasma donde fosforila a sus sustratos. Estos

sustratos son proteínas relacionadas con procesos de apoptosis, como por ejemplo proteínas de la familia Bcl-2. La activación de Akt provoca la fosforilación de la proteína proapoptótica BAD, que una vez fosforilada se disocia del factor de supervivencia Bcl-xL y se une a proteínas de la familia 14-3-3 que la retienen en el citoplasma y no permiten que se traslade a la mitocondria. La que sí se traslada a la mitocondria una vez disociada de BAD es Bcl-xL, donde ejerce su papel antiapoptótico evitando la salida de citocromo c al citoplasma (Harada et al, 2004; Lopez-Neblina et al, 2005). Por otro lado Akt previene la activación de la caspasa 9 por parte del citocromo c por fosforilación de ésta. Por lo tanto, una de las maneras de Akt para prevenir la muerte celular es preservar la integridad de las mitocondrias (Kandel et al, 1999; Li et al, 2005).

Además, Akt tiene otros sustratos, como factores de transcripción de la familia *forkhead* cuya fosforilación los une a proteínas 14-3-3 y los mantiene en el citoplasma evitando que puedan entrar en el núcleo y promover la expresión de genes relacionados con muerte celular. Esto tiene lugar, por ejemplo, para evitar la muerte en respuesta a proteínas proapoptóticas como el ligando de Fas (Harada et al, 2004; Paez et al, 2003).

Además de actuar inhibiendo rutas proapoptóticas, Akt también activa la expresión de genes antiapoptóticos, como es por ejemplo el caso del gen del NF- κ B (Vivanco et al, 2002).

Teniendo en cuenta que Akt es principalmente una proteína que media supervivencia celular en casos de isquemia/reperfusión, y estos se producen en numerosos procesos clínicos, se considera la posibilidad de utilizar esta proteína como terapia para preservar la viabilidad celular en órganos o tejidos sometidos a este tipo de daño. Sin embargo, aunque en animales de experimentación y en cultivos celulares se ha visto que la actividad de Akt puede modularse teniendo resultados favorables tanto de manera farmacológica como genéticamente, aún serán necesarios muchos más estudios para poder llegar a aplicar estas terapias en seres humanos (revisado por Mullonkal et al, 2007).

3.2 PKC (*Protein Kinase C*).

La familia de las proteínas quinasa C (PKCs) comprenden un grupo de más de 11 serina/treonina quinasas citoplasmáticas que regulan procesos como el crecimiento,

la proliferación y la muerte celular. Se dividen en tres grupos en función de los cofactores necesarios para su activación, que pueden ser fosfolípidos, fundamentalmente diacilglicerol (DAG) y/o calcio. El mayor o principal efecto biológico de los miembros de la familia PKC es la regulación de factores de transcripción y el control del ciclo celular. Además, numerosos estudios han revelado que tiene una gran implicación en la progresión tumoral, ya que regula diferentes procesos celulares como la mitosis, adhesión celular, apoptosis, angiogénesis, metástasis, e invasión. Esto concuerda con el hecho de que la proteína sea activada por sustancias de naturaleza oxidante y carcinogénica e inhibida por sustancias que pueden tener un papel protector frente a la carcinogénesis o la progresión tumoral (Gopalakrishna et al, 2000).

La capacidad para ser regulada tanto por moléculas de naturaleza oxidante como por antioxidantes, se la proporciona su estructura. Está constituida por un dominio regulador en el extremo N-terminal y por un dominio catalítico C-terminal. El dominio regulador presenta una zona rica en residuos de cisteína que puede unir átomos de zinc. Cuando esto es así, el dominio regulador actúa regulando negativamente o inhibiendo el dominio catalítico. Las moléculas de naturaleza oxidante alteran esta estructura, ya que alteran los residuos de cisteína, de manera que el dominio regulador deja de ser inhibitorio y la proteína pasa a estar constitutivamente activa. Como consecuencia de esto PKC puede fosforilar a sus sustratos promoviendo o favoreciendo la formación o progresión tumoral. El dominio catalítico también presenta varios residuos de cisteína que son imprescindibles para la actividad de la proteína. Con estos residuos de cisteína pueden interaccionar determinados antioxidantes o agentes que se consideran como preventivos del desarrollo tumoral, como la vitamina E y sus derivados, agentes polifenólicos o derivados del selenio. Estos agentes modifican o alteran los residuos de cisteína formando puentes disulfuro entre ellos, de manera que el dominio catalítico no puede llegar a activarse. A modo de resumen, podemos decir que los agentes oxidantes promueven la activación de PKC alterando la estructura del dominio regulador e impidiendo que interaccione con átomos de zinc, y los agentes antioxidantes inhiben la actividad de PKC impidiendo la activación del dominio catalítico y por lo tanto su actividad quinasa (Boscoboinik et al, 1991; Chen et al, 1996; Gopalakrishna et al, 1997).

Aunque la regulación en respuesta a agentes oxidantes de todas las isoformas de la familia PKC es similar, se ha demostrado que cada isoforma tiene funciones o efectos específicos dependiendo del tipo de tejido o del tipo de célula (Dempsey et al, 2000).

3.3. MAPKs.

El grupo de proteínas citoplasmáticas denominadas proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) son un grupo de proteínas muy conservado evolutivamente en todas las células eucariotas. Son además el sistema de señalización intracelular más ampliamente estudiado que existe (Kyriakis et al, 2001; Widmann et al, 1999). Son las encargadas de transmitir señales generadas por estímulos tanto extra como intracelulares hacia el núcleo de la célula. Teniendo en cuenta que se activan tanto en respuesta a señales mitogénicas como a señales relacionadas con estrés celular, su regulación mediante el potencial de oxido-reducción es también un objetivo claro e importante de estudio en la biología de estas quinasas. Durante los procesos de comunicación o señalización celular las MAPK pueden recibir información que modula su actividad en respuesta a la activación de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTKs), que son activados por hormonas como la insulina o factores de crecimiento como el EGF o el PDGF. Su actividad también puede modularse en respuesta a proteínas que no son receptores con actividad tirosina quinasa, en respuesta a receptores de citoquinas, en respuesta a receptores asociados a proteínas G heterotriméricas o en respuesta a estrés ambiental como el estrés osmótico, choque térmico, radiaciones ionizantes o isquemia. La actividad de estas proteínas puede coordinar un gran número de procesos de gran relevancia en la fisiología celular, como la activación de la transcripción de genes, síntesis de proteínas, control de la maquinaria que regula el ciclo de la célula, muerte o diferenciación celular.

Cada ruta de las MAPK normalmente está formada por un triple módulo de señalización consistente en una secuencia de fosforilaciones en residuos de serina y/o treonina y/o tirosina donde cada quinasa fosforila y activa a su sustrato. Este módulo está constituido por lo tanto por un grupo de tres quinasas, una MAPKKK (MAP3K), que fosforila y activa a una MAPKK (MAP2K), que a su vez fosforila y activa a una MAPK (**figura 4**) (Widmann et al, 1999).

Hay tres familias clásicas que conforman tres rutas principales de MAPK. La ruta de las ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) fue la primera ruta de las MAPK en ser descubierta, incluye ERK1 y ERK2, que regulan sobre todo procesos de crecimiento y diferenciación celular. Las JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), también denominadas SAPK (*stress activated protein kinases*), incluyen JNK1, JNK2 y JNK3; y las p38, incluyen p38 α , p38 β , p38 γ , y p38 δ . Tanto los miembros de la familia JNK, como los miembros de la familia p38 se activan sobre todo en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental entre los cuales se incluye el estrés oxidativo. Hay otra familia de MAPK, que también se activa en respuesta a estrés, que está constituida por un único miembro, ERK5, y que también se denomina BMAPK1 (*big MAPK1*) (revisado por Dröge et al, 2002, Thannickal et al, 2000, Valco et al, 2007).

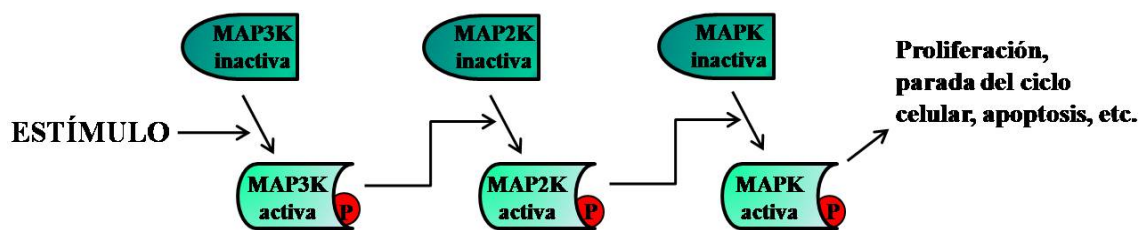


Figura 4.- Esquema de la secuencia de fosforilaciones que suponen la activación y la transmisión de las señales a través del modulo triple quinasa que forma cada ruta de las MAPK.

Las encargadas de iniciar la ruta de señalización son las MAP3K. Se clasifican en tres familias (MEKK, MLK y TAO) que incluyen numerosos miembros, algunos de los cuales pueden activar varias rutas de las MAPK. Por ejemplo, alguno de los miembros de la familia MEKK puede activar la ruta de las ERK, de las JNK y de p38. Los miembros de la familia MLK activan la ruta de las JNK, y los miembros de la familia TAO la ruta de p38. Su actividad puede estar regulada por un amplio número de factores, y una vez que se activan provocan la activación por fosforilación de residuos de serina/treonina localizados en el subdominio VIII del dominio quinasa de las MAP2K, también denominadas MEKs o MKKs (*MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-Kinase*). Las MAP2K están contituidas por 7 miembros. MEK1 y MEK2

que activan la familia de las ERK. MKK4 (también denominada SEK1) y MKK7 que activan la ruta de las JNK. MKK3 y MKK6 que activan la familia de p38 y MEK5 que activa la familia de ERK5. Las MAP2K activan por fosforilación en residuos de treonina o tirosina, también localizados en el subdominio VIII del dominio catalítico, a las MAPK (**figura 5**) (Kyriakis et al 2001; Valko et al, 2006).

La activación de la ruta de ERK tiene lugar en respuesta sobre todo a estímulos mitogénicos. Esta activación está relacionada mayormente con procesos de diferenciación y de control del ciclo celular. Estos estímulos mitogénicos provienen sobre todo de citoquinas y de diferentes factores de crecimiento (Neufeld et al, 1999; Sundaresan et al, 1996). Como ya se ha mencionado anteriormente, la unión de estos ligandos a sus receptores de membrana provoca la generación de pequeñas cantidades de ROS en el interior de la célula. Estas pequeñas cantidades de radicales libres son en parte responsables de la activación de la ruta de ERK. Se ha llegado a esta conclusión, ya que la activación de ERK se inhibe o no tiene lugar en presencia de antioxidantes (Wilmer et al, 1997). Esta ruta empieza con la activación de una MAP3K, las más frecuentes en la ruta de ERK son los miembros de la familia Raf (A-Raf, B-Raf y Raf1), que tienen como sustrato una MAP2K, MEK1 o MEK2 (también denominadas MKK1 y MKK2 respectivamente) y que por último activan a ERK1 o ERK2. Aunque se ha comprobado que la activación de ERK ocurre en diferentes tipos celulares, también parece estar claro, que esta activación mediada por las ROS es un proceso que puede depender tanto del tipo de célula como del tipo de estímulo. El hecho de que la ruta de ERK sea activada en respuesta a este tipo de radicales concuerda con los datos descritos por Burdon y colaboradores que demuestran que pequeñas concentraciones de ROS pueden tener un efecto mitogénico o proliferativo en algunos tipos celulares (Burdon et al, 1995). La activación de ERK también se produce en respuesta al estrés oxidativo suministrado exógenamente, como por ejemplo el tratamiento con peróxido de hidrógeno o radiación UV. Estos provocan la activación de los receptores con actividad tirosina quinasa que a su vez provocan el aumento de la concentración de ROS intracelular. Otro hecho que contribuye o puede cooperar en la activación de ERK en respuesta a estrés oxidativo es que en estas condiciones las fosfatasa se encuentran inactivadas de manera que es siempre mayor la tendencia a que las rutas de las quinasas se activen o se mantengan activadas (Wishler et al, 1995).

Las rutas de JNK/SAPK y p38 están implicadas en procesos relacionados con el control de la supervivencia celular. Ninguna de las dos vías se activa en respuesta a factores de crecimiento o a insulina como ocurre en el caso de las ERK. Tanto la actividad de las JNK como de las p38 se ve aumentada en respuesta a los mismos estímulos. Puede decirse que se activan en situaciones de estrés como la radiación UV, la radiación- γ , choque térmico, estrés osmótico, en respuesta a citoquinas producidas en procesos inflamatorios de la superfamilia TNF como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la interleuquina-1 (IL-1). También se activan en respuesta a péptidos vasoactivos como la endotelina y la angiotensina II. Existe una diferencia en cuanto a la activación de ambas vías en procesos de isquemia y reperfusión. Mientras que la ruta de p38 se activa durante ambos procesos, la ruta de las JNK solamente se activa durante la reperfusión (revisado por kyriakis et al, 2001). Son todas situaciones donde hechos como la supervivencia o la muerte celular tienen gran relevancia, y son los dos aspectos fundamentales de la biología celular que regulan estas dos familias de quinasas. Se han identificado 11 MAP3K implicadas en la activación de las rutas de JNK y p38, sin embargo algunas de ellas son específicas de una sola ruta. La ruta de las JNK es activada fundamentalmente por miembros de la familia MLK de las MAP3K. La ruta de p38 es activada principalmente por la familia TAO de las MAP3K, aunque existe cierta promiscuidad a la hora de llevar a cabo la activación de ambas rutas por parte de las MAP2K y de las MAP3K (**figura 5**).

Todas estas condiciones de estrés arriba descritas conducen en mayor o menor medida, dependiendo de la duración y de la intensidad del estímulo, a la aparición de ROS y a un desplazamiento en el equilibrio de los grupos tiol/disulfuro intracelular. Tanto la presencia de ROS como la ruptura del potencial de oxido-reducción de la célula activa la ruta de las JNK y p38.

Los miembros de la familia de las JNK tienen otra manera de ser regulados que revelan su implicación o participación en procesos relacionados con el estrés oxidativo. Las proteínas de la familia JNK pueden estar acomplejadas y catalíticamente inhibidas con el glutatión S-transferasa Pi (GSTp). Esto deja inaccesible el dominio de activación y por lo tanto limita la fosforilación de los sustratos de las JNK en condiciones normales. La exposición a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno o la ruptura del potencial de oxido-reducción de las células por un aumento de las especies de naturaleza oxidativa, provoca la dimerización del GSTp y por lo tanto deja expuesto el

sitio catalítico de las JNK de manera que éstas pueden ser activadas y fosforilar a sus sustratos (Adler et al, 1999).

En cuanto a ERK5, fue clonada y descrita por primera vez en 1995 por dos grupos independientes (English et al, 1995; Zhou et al, 1995) y no presenta ningún otro homólogo en mamíferos. Se ha demostrado que puede activarse en condiciones de estrés ambiental, de hecho muestra una mayor activación que la ruta de las ERK1/2 en respuesta a peróxido de hidrógeno. Por este motivo, se cree que también puede regular aspectos importantes de la biología celular en respuesta a este tipo de estrés. Sin embargo, se ha demostrado también que no se activa en respuesta a otros factores que sí pueden activar alguna de las otras rutas de las MAPK como citoquinas proinflamatorias o péptidos vasoactivos.

3.3.1 ASK1 (*apoptotic signal-regulating kinase*). La proteína quinasa regulada por señales de apoptosis ASK1 (también denominada *MAP-kinase kinase kinase 5*, MAPKKK5) es una MAP3K perteneciente a la familia MEKK. Una vez activada, sus sustratos pueden ser cuatro MAP2K, MKK4 (también denominada SEK1), MKK7, MKK3 y MKK6. MKK4 y MKK7 activan las JNK y MKK3 y MKK6 activan a p38 (**figura 5**).

ASK1 es una serina/treonina quinasa que fue clonada por primera vez por dos grupos independientes (Ichijo et al, 1997; Wang et al 1996). Ambos grupos la clonaron utilizando como estrategia la PCR con oligonucleótidos degenerados para elementos conservados de los subdominios VI y VIII de las serina/treonina quinasas. En humanos posee 1374 aminoácidos y 1379 en ratón (Ichijo et al, 1997; Tobiume et al, 1997). Se activa en respuesta a $\text{TNF}\alpha$, lipopolisacáridos (LPS), estrés en el retículo endoplasmático, aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{+2} , y ROS, siendo estas últimas sus activadores más potentes (revisado por Fujino et al, 2006).

Funcionalmente, está implicada en diferentes procesos relacionados con supervivencia y diferenciación celular en respuesta a estrés que dependen sobre todo del tipo de célula, de la cantidad de ASK1 expresada y del tipo y duración del estímulo que la activa. Su sobreexpresión provoca apoptosis en células epiteliales cultivadas con bajas concentraciones de suero mediante la activación de las rutas de JNK y p38 (Ichijo

et al, 1997). También puede provocar o bien apoptosis o bien diferenciación en queratinocitos dependiendo de si se sobreexpresa en mayor o menor grado respectivamente (Sayama et al, 2000). Hatai y colaboradores caracterizaron bioquímicamente el tipo de muerte inducido por ASK1. Demostraron que la muerte que provoca ASK1 tiene características de apoptosis ya que es dependiente de la activación de las caspasas. Tiene lugar a través de la vía intrínseca o mitocondrial y no a través de receptores de muerte como por ejemplo el ligando de Fas (FasL) (Hatai et al, 2000). En concordancia con estos resultados, está el hecho de que células deficientes en ASK1 son más resistentes a la muerte inducida por H_2O_2 (Tobiume et al, 2001).

La regulación de la actividad de ASK1 es un claro ejemplo de cómo las enzimas implicadas en el control del estado oxidativo de la célula, como por ejemplo la Trx, intervienen en la actividad de rutas, como en este caso la ruta de las MAPK, en respuesta a estrés oxidativo. La Trx, en función de su grado de oxidación, permite o no la activación de ASK1.

Se demostró que la Trx interacciona con ASK1 mediante un ensayo de doble híbrido, concretamente se une al extremo N-terminal inhibiendo su actividad quinasa. La Trx tiene en su secuencia de aminoácidos dos residuos de cisteína (concretamente en las posiciones 32 y 35) que son susceptibles de ser oxidados en respuesta a ROS. Cuando aumenta el estado de oxidación de la célula, estos residuos de cisteína forman puentes disulfuro pasando Trx de su estado reducido $[Trx-(SH)_2]$ y unido a ASK1, a su estado oxidado ($Trx-S_2$) en el cual no puede unirse a ASK1. Al disociarse la Trx, ASK1 pasa a estar activa ya que se permite la fosforilación del residuo de treonina de la posición 838 en humanos y 845 en ratón. Es por este motivo que un mutante de ASK1 con una delección en el extremo N-terminal ($ASK1\Delta N$) permanece constitutivamente activo, ya que no posee lugar de unión de la Trx (Liu et al, 2000; Saitoh et al, 1998; Tobiume et al, 2002).

La actividad de ASK1 también está regulada por la proteína fosfatasa 5, PP5, que provoca la inhibición de ASK1 pero actuando a diferente nivel que la Trx. Se descubrió que la PP5 interacciona con ASK1 también mediante un ensayo de doble híbrido. Esta interacción aumenta por tratamiento con H_2O_2 y TNF de manera dosis y tiempo dependiente por lo tanto es mayor cuando ASK1 está activada. Lo que hace la PP5 es defosforilar el residuo de Thr838 y así evita la activación durante tiempos muy

largos de ASK1. Al promover la defosforilación de ASK1 y reducir su actividad quinasa, también evita la activación sostenida durante mucho tiempo de la actividad de JNK y p38. Otra consecuencia de la inhibición de ASK1, JNK y p38 por parte de la PP5 es la inhibición de la apoptosis dependiente de ASK1 (Morita et al, 2001).

En la regulación de ASK1 en respuesta a ROS intervienen además otras proteínas como el factor 2 y el factor 6 asociados al factor de necrosis tumoral, TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) y TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 2*). En células no sometidas a estrés ASK1 forma complejos de alto peso molecular (15000-20000 KDa) junto con la Trx y otras proteínas todavía no identificadas con las que oligomeriza por su extremo C-terminal. Cuando en respuesta a ROS la Trx se disocia de estos complejos estos se vuelven aún de mayor tamaño, lo que indica que otras proteínas deben unirse al complejo. Además de unirse otras proteínas, al quedar libre el extremo N-terminal de ASK1 como consecuencia de la liberación de la Trx, las moléculas de ASK1 pueden oligodimerizar también mediante interacciones hidrofóbicas por éste extremo. Para que el complejo se vuelva activo deben unirse también TRAF2 y TRAF6. Ambas proteínas son adaptadores o intermediarios en la activación de JNK, p38 y NF- κ B en respuesta a TNF y H₂O₂. Esta activación está mediada por interacción con MAP3K como MKK1 y ASK1 en la activación de JNK, y TAK1 y MEKK3 en la activación de p38. Esto se ha demostrado mediante experimentos con fibroblastos de ratón embrionario (MEFs) deficientes en estas dos proteínas donde se ha comprobado que la activación de JNK y p38 y la muerte inducida en respuesta a H₂O₂ se reduce significativamente. Por lo tanto, puede decirse que ambas proteínas son necesarias para la formación de los complejos de alto peso molecular de ASK1 activos.

Para verificar la participación de ASK1 en la respuesta al estrés oxidativo se creó un ratón deficiente en la expresión de esta proteína interrumpiendo la expresión de su gen. Los ratones sin ASK1 nacen según la frecuencia mendeliana esperada y además son indistinguibles por su aspecto externo de los ratones que sí expresan ASK1. Tampoco se detectan anomalías mediante examen microscópico de sus tejidos. Sin embargo, cultivos de fibroblastos embrionarios de estos ratones, muestran una gran reducción en la apoptosis inducida en respuesta a estrés oxidativo. También muestran una disminución de la actividad quinasa sostenida pero no de la actividad transitoria de JNK y p38. Esto indica que la actividad sostenida de JNK y p38 es necesaria para la apoptosis. También se ve reducida en estas células la actividad sostenida de JNK y p38

en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ así como la cantidad de apoptosis. (Matsuzawa et al, 2002; Tobiume et al, 2001).

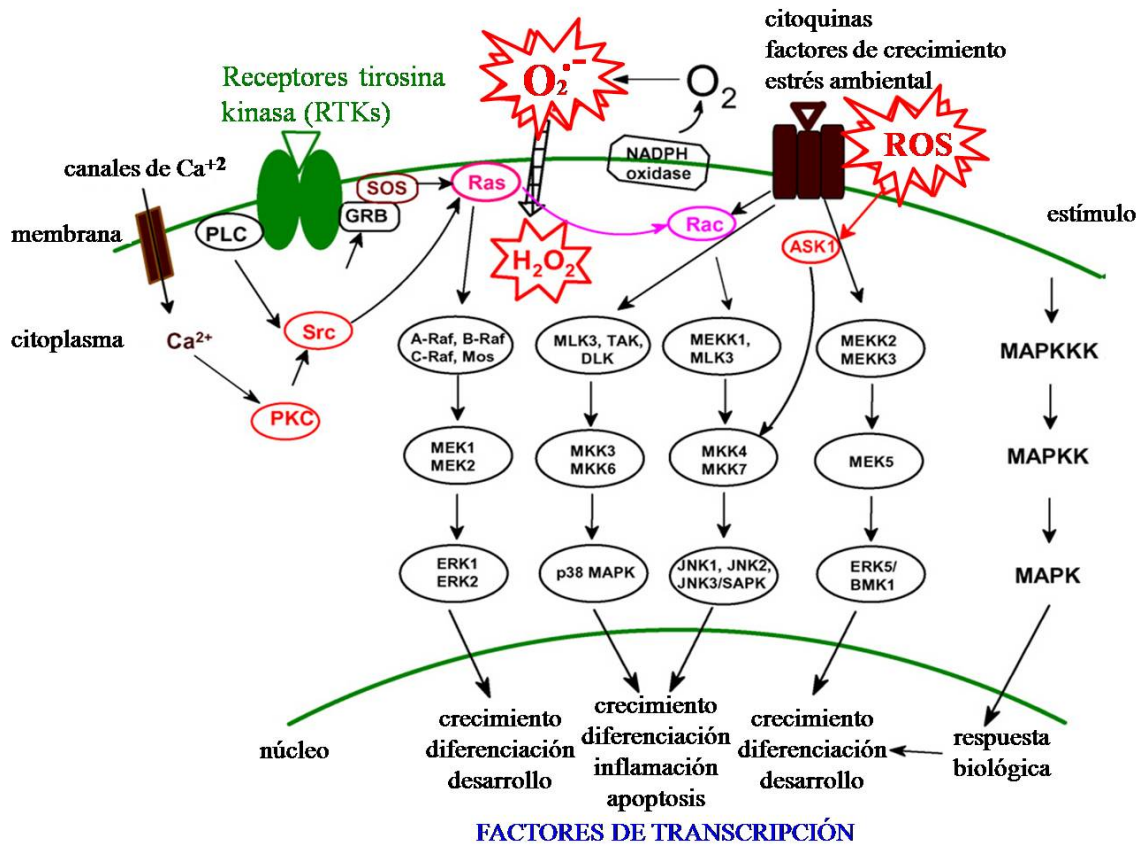


Figura 5.-Esquema de la activación de las diferentes rutas de señalización de las MAPKs. Puede comprobarse como las especies reactivas del oxígeno están implicadas en la activación de alguna de estas rutas. Adaptado de Valco et al. 2007. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*.

Utilizando cultivos de neuronas deficientes en ASK1, se ha comprobado que ésta también es importante o está implicada en la degeneración o muerte neuronal en respuesta a β amiloide. En cultivos de neuronas tratadas con β amiloide se activa la ruta de JNK de manera dependiente de las ROS. Esto no ocurre en cultivos de neuronas deficientes en ASK1, lo que implica que la activación de ASK1-JNK dependiente de ROS puede jugar un papel importante en la neurotoxicidad inducida por el β amiloide.

3.3.2 Sustratos de las MAPK que median sus efectos biológicos. Como ya se ha mencionado con anterioridad, probablemente el mayor efecto de las especies reactivas del oxígeno en la señalización celular tiene lugar sobre la ruta de las MAPK, y probablemente éstas sean los reguladores más importantes de la respuesta celular a las ROS (revisado por Dröge et al, 2002; Valco et al, 2007). Una vez activadas, estas rutas median la respuesta celular al estrés actuando sobre diferentes sustratos que pueden ser otras quinasas o sobre todo factores de transcripción gracias a los cuales controlan la expresión de diferentes genes implicados en la reparación del ADN, en la parada del ciclo celular de células dañadas, en respuestas inflamatorias, en muerte celular, en diferenciación celular, etc (**figura 5**).

Sin embargo, no todos los sustratos de las MAPK median respuesta celular a estrés oxidativo, hay algunos que solo están implicados en la respuesta a mitógenos, otros implicados en la respuesta a estrés y hay otros implicados en la respuesta a ambos tipos de estímulos. A este nivel es donde se integran todas las señales procedentes de los diferentes estímulos a los que están sometidas las células, y en función del equilibrio o balance entre las distintas señales será la respuesta de cada célula en particular.

Uno de los efectos mediados por las MAPK en respuesta a estrés y citoquinas inflamatorias es la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la proteína de choque térmico o chaperona Hsp27. Una vez activadas las JNK, a través de sus sustratos las proteínas quinasa 2 y 3 activadas por MAPKs (MAPKAP-K2/3) provocan la fosforilación y por lo tanto la ruptura de los multímeros que forma Hsp27 implicados en la remodelación de la cromatina. Una vez fosforilada, Hsp27 forma dímeros o monómeros que se unen a los filamentos de actina F promoviendo la reorganización de ésta en fibras de estrés. Lo mismo ocurre tras la activación de la ruta de p38, pero en este caso la quinasa sustrato de p38 y que fosforila a Hsp27 es la quinasa activada y regulada por p38, PRAK1. Se ha podido demostrar que los efectos de las MAPK sobre la organización de citoesqueleto mediados por Hsp27 están regulados tanto por la ruta de JNK como por la de p38, pero no por ERK1/2, ya que Hsp27 es sustrato de MAPKAP-K2/3 y de PARK1, pero éstas no pueden ser activadas por ERK1/2 *in vivo* (Clerk et al, 1998, Kyriakis et al, 2001).

La proteína quinasa activada por mitógenos y por estrés MSK1 es otra de las quinasas sustrato de ERK y de p38 y que por lo tanto se activa en respuesta a elementos

mitogénicos y a estrés. Esta proteína se ha visto que está implicada en la activación del factor de transcripción de elementos de respuesta a AMPc (*cyclic adenosine monophosphate*) CREB (*cyclic AMP response element (CRE)-binding protein*). Otra de las funciones de MSK1 parece ser la de remodelar el grado de condensación de la cromatina, favoreciendo su desenrollamiento en respuesta a estímulos mitogénicos y relacionados con estrés para que ésta esté más accesible a los factores de transcripción. En esta remodelación de la cromatina en la que participa MSK1 se ha visto que están implicadas reacciones tanto de fosforilación como de acetilación de histonas (Kyriakis et al, 2001).

En cuanto a factores de transcripción activados por las MAPK, existe otro de la familia CREB denominado CHOP/GADD153. Su activación tiene lugar en respuesta a estímulos genotóxicos y a estrés inflamatorio y se produce gracias a la fosforilación de los residuos de Ser-78 y de Ser-81, que puede ser llevada a cabo por p38 tanto *in vivo* como *in vitro* pero no por JNK ni por ERK. Una vez activado, participa en la represión de la expresión de genes inducidos por AMPc y activa la expresión de genes inducidos por estrés. De esta manera favorece la parada del ciclo celular entre las fases G₁/S y la reparación del ADN antes de su replicación para mantener la estabilidad genómica (Wang et al, 1996).

El factor de transcripción factor nuclear de células T activadas, NFAT, se encuentra normalmente retenido en el citoplasma como consecuencia de su fosforilación. Es defosforilado por la fosfatasa calcineurina, que se activa en respuesta a un aumento de la concentración de calcio en el citoplasma. La calcineurina defosforila a NFAT de manera que se traslada al núcleo al quedar expuesta la señal de localización nuclear. En el núcleo promueve la transcripción de genes implicados en diferenciación, angiogénesis o formación de citoquinas. Parece ser que la activación de las MAPK, concretamente de JNK inhibe la defosforilación de NFAT evitando su translocación al núcleo. De hecho, NFAT2 es esencial para la diferenciación de las T_H al fenotipo efector T_H2. El grupo de Chow y colaboradores han demostrado que las JNK pueden fosforilar a NFAT2 inhibiendo su paso al núcleo de la célula, y como la inhibición de las JNK provoca el aumento de la forma diferenciada T_H2 en células T_H (Chow et al, 1999; 2000).

AP-1 es otro de los factores de transcripción que median respuesta a estrés, y puede ser activado por la ruta de JNK, de p38 y de ERK5 tanto en respuesta a oxidantes suministrados de forma exógena como en respuesta a ligandos que favorecen el aumento de la concentración de ROS en el citoplasma de la célula. El complejo AP-1 está formado por heterodímeros de proteínas de la familia Jun (normalmente c-Jun o JunD), de la familia fos, normalmente c-Fos y de la familia ATF, normalmente ATF2. Los dímeros pueden estar constituidos por proteínas Jun-Jun, Jun-Fos o Jun-ATF. La presencia de cada familia posibilita al complejo AP-1 la unión a diferentes promotores y por lo tanto la regulación de distintos genes dependientes de cada familia. La activación en respuesta al cambio del potencial de oxido-reducción de la célula viene mediada por la oxidación de un residuo de cisteína presente en la secuencia consenso Lys-Cys-Arg de Jun y Fos. El cambio de actividad del complejo AP-1 puede tener lugar por fosforilación o defosforilación directa de determinados aminoácidos de las proteínas que lo componen o bien mediante regulación transcripcional de los niveles de Jun y Fos. Este complejo controla la expresión de genes implicados en diferenciación y en respuestas inflamatorias, como por ejemplo proteasas o proteínas que regulan la adhesión celular (Kyriakis et al, 2001; Thannickal et al, 2000).

El factor nuclear κ B, NF- κ B ha sido el primer factor de transcripción que se ha descubierto que se activa en respuesta a estrés oxidativo en células eucariotas. Media respuesta a reacciones inflamatorias, respuesta inmunitaria, crecimiento celular y apoptosis. También se ha demostrado que puede estar implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con proliferación, transformación y angiogénesis. La respuesta o la activación de NF- κ B es dependiente tanto del tipo de célula como del tipo de estímulo y no es exclusiva de procesos en los que está implicado el estrés oxidativo, pero en estos procesos puede ser activado tanto por peróxido de hidrógeno (aunque no en todos los tipos celulares) como por un aumento en el estado de oxidación del glutatión intracelular (revisado por Valco et al, 2007).

III. EL GRUPO DE LAS PROTEÍNAS STE20. MAP4K.

El grupo de las proteínas Ste20 son un grupo serina/treonina quinasas que también están implicadas en mediar o modular la respuesta a diferentes tipos de estrés celular, entre ellos el estrés oxidativo. Estas proteínas son las ortólogas en mamíferos de

la proteína Ste20p de la levadura *Schizosaccharomyces cerevisiae*. Ste20p posee ortólogos también en otros organismos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, lo que significa que está evolutivamente conservada y esto puede ser un indicio de que su función es importante para las células.

1. Ste20p de levaduras.

En levaduras existen cinco rutas de MAPK que regulan la esporulación, la remodelación de la pared, la síntesis de compuestos osmolíticos, la filamentación y la división por gemación. Ste20p está implicada en la división por gemación en respuesta a feromonas peptídicas en estos organismos, un aspecto caracterizado en 1992 por el grupo de Leberer y colaboradores (Leberer et al, 1992). Poco después, en 1994 se describieron los primeros homólogos de Ste20p en mamíferos, uno de cada una de las dos familias en que actualmente se dividen las Ste20 (Katz et al, 1994; Manser et al, 1994). Un hecho de especial notoriedad fue el descubrimiento de que Ste20p actúa como una MAP4K en levaduras, es decir, fosforila y activa a una MAP3K (Wu et al, 1995; Drogen et al, 2000). Concretamente la ruta de activación de Ste20p empieza con la unión de las feromonas a sus receptores de membrana. Estos receptores están acoplados a proteínas G heterotriméricas que provocan la fosforilación de Ste20p. Ste20p (MAP4K) fosforila a Ste11p (MAP3K). La fosforilación de Ste11p provoca su activación interrumpiendo la interacción de su dominio regulador N-terminal con su dominio catalítico C-terminal y esto permite que fosforile a Ste7p (MAP2K) que por último fosforila a Fus3p o Kssp (MAPKs), que se trasladan a núcleo y promueven la transcripción de genes (**figura 6**).

2. Clasificación y funciones de las proteínas Ste20.

En mamíferos el grupo de las proteínas Ste20 carece de categoría taxonómica y está formado por unas 30 quinasas que actualmente se agrupan en dos familias. La última clasificación de las Ste20 la realizó Ippeita Dan en el 2001 (Dan et al, 2001). En esta clasificación agrupó a los miembros de las Ste20 en dos familias, la familia PAK (*p21-activated kinases*) y la familia GCK (*Germinal Center Kinases*) (**figura 7**).

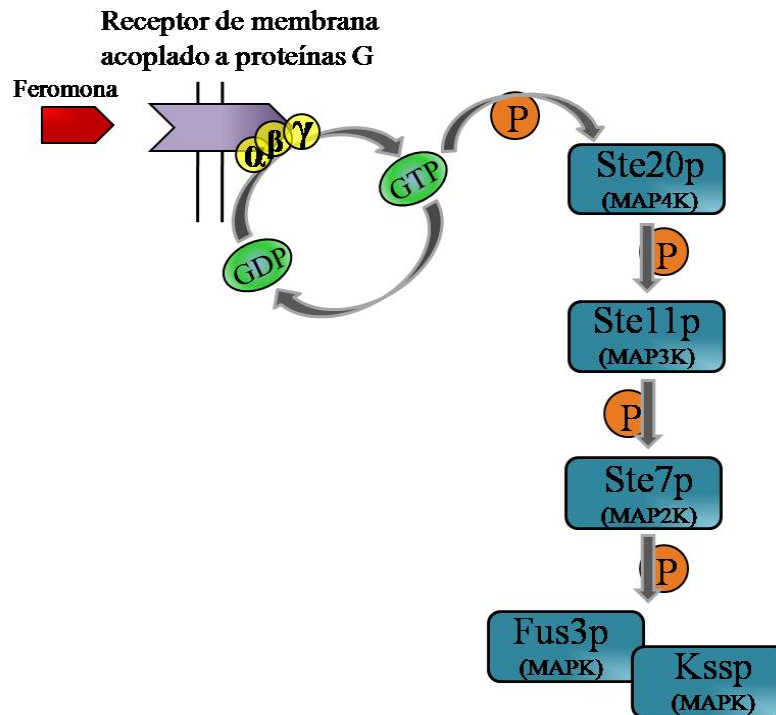


Figura 6.-Esquema en el que se muestra la activación de Ste20p en respuesta a la unión de feromonas peptídicas a sus receptores de membrana acoplados a proteínas G. Las proteínas G heterotriméricas promueven el intercambio GDP/GTP y fosforilan y activan a Ste20p. Ste20p actúa como una MAP4K fosforilando a la MAP3K Ste11p.

Aunque históricamente el grupo de las Ste20 se ha dividido en tres familias, la familia PAK, la familia GCK-I y la familia GCK-II. Estudios filogenéticos, sobre todo los que han incluido los ortólogos en *Drosophila* y *C. elegans* han apoyado la clasificación actual en dos familias y varias subfamilias dentro de éstas. Se cree que esta clasificación es más correcta ya que para cada subfamilia englobada en las dos familias de mamíferos se ha encontrado un ortólogo tanto en *Drosophila* como en *C. elegans*. Esto demuestra que la estructura básica o el prototipo de cada subfamilia se estableció en etapas muy tempranas del desarrollo de los organismos pluricelulares, concretamente, esta estructura básica debió de establecerse antes de la emergencia de los nematodos y pasó con la evolución a medida que fueron emergiendo los organismos pluricelulares.

La actual división en dos familias atiende principalmente a la diferente localización de dominio catalítico. En los miembros de la familia PAK se localiza en el extremo C-terminal a igual que en Ste20p, y en los miembros de la familia GCK se localiza en el extremo N-terminal. Otra diferencia entre ambas familias es que los

miembros de la familia PAK poseen secuencias de unión para proteínas de la familia Rac y Cdc42 que intervienen en su activación. Sin embargo en la familia GCK no existen estas secuencias de reconocimiento. El dominio catalítico se mantiene altamente conservado y posee una elevada homología tanto en levaduras como en ambas familias de mamíferos. Este dominio se divide en 11 subdominios (Hanks et al, 1995). En el subdominio VIII de las Ste20 se encuentra un péptido distintivo de este grupo que es la secuencia de identidad de las Ste20 (v/i)GTPyWMAPEv (las minúsculas indican aminoácidos menos conservados). Teniendo en cuenta que el subdominio VIII es en la mayoría de las quinasas el responsable de la selectividad de sustratos, y dado que en este grupo está tan conservado, cabría esperar que todas estas proteínas tuvieran sustratos similares.

En la familia PAK se incluyen dos subfamilias (PAK-I y PAK-II) que engloban 6 kinasas. En la familia GCK se incluyen 8 subfamilias (GCK-I, GCK-II, GCK-III, GCK-IV, GCK-V, GCK-VI, GCK-VII y GCK-VIII o familia TAO), que engloban un total de 22 miembros (**figura 7**). La clasificación en subfamilias se ha hecho utilizando como principal criterio el dominio catalítico o dominio quinasa, sin embargo se ha comprobado que una clasificación filogenética basada en el dominio no catalítico sería bastante similar. Esto indica que los distintos miembros de este grupo poseen diferencias estructurales tanto en el dominio quinasa como en el dominio no catalítico.

Las funciones de las Ste20 de mamíferos están actualmente siendo objeto de numerosos estudios. Se ha visto que pueden estar implicados en numerosos procesos, sin embargo existen varias para las cuales aún no se determinó una función o por lo menos un mecanismo de acción claro. Uno de los aspectos que más interés ha suscitado, sobre todo a raíz del descubrimiento de que Ste20p actúa como una MAP4K en levaduras, es el hecho de que puedan regular o modular la actividad de las MAPK en los niveles superiores de la ruta, aspecto que en numerosos casos todavía no está caracterizado en profundidad. Sin embargo, se ha visto que las Ste20 están implicadas en numerosos procesos celulares que quizás controlen a través de la vía de las MAPK o a través de otras vías aún sin caracterizar. Como ejemplos de estos procesos se pueden citar el control de determinados aspectos de la biología celular en respuesta a diferentes factores o diferentes tipos de estrés como el volumen celular, la progresión del ciclo, la diferenciación, la organización del citoesqueleto o la supervivencia.

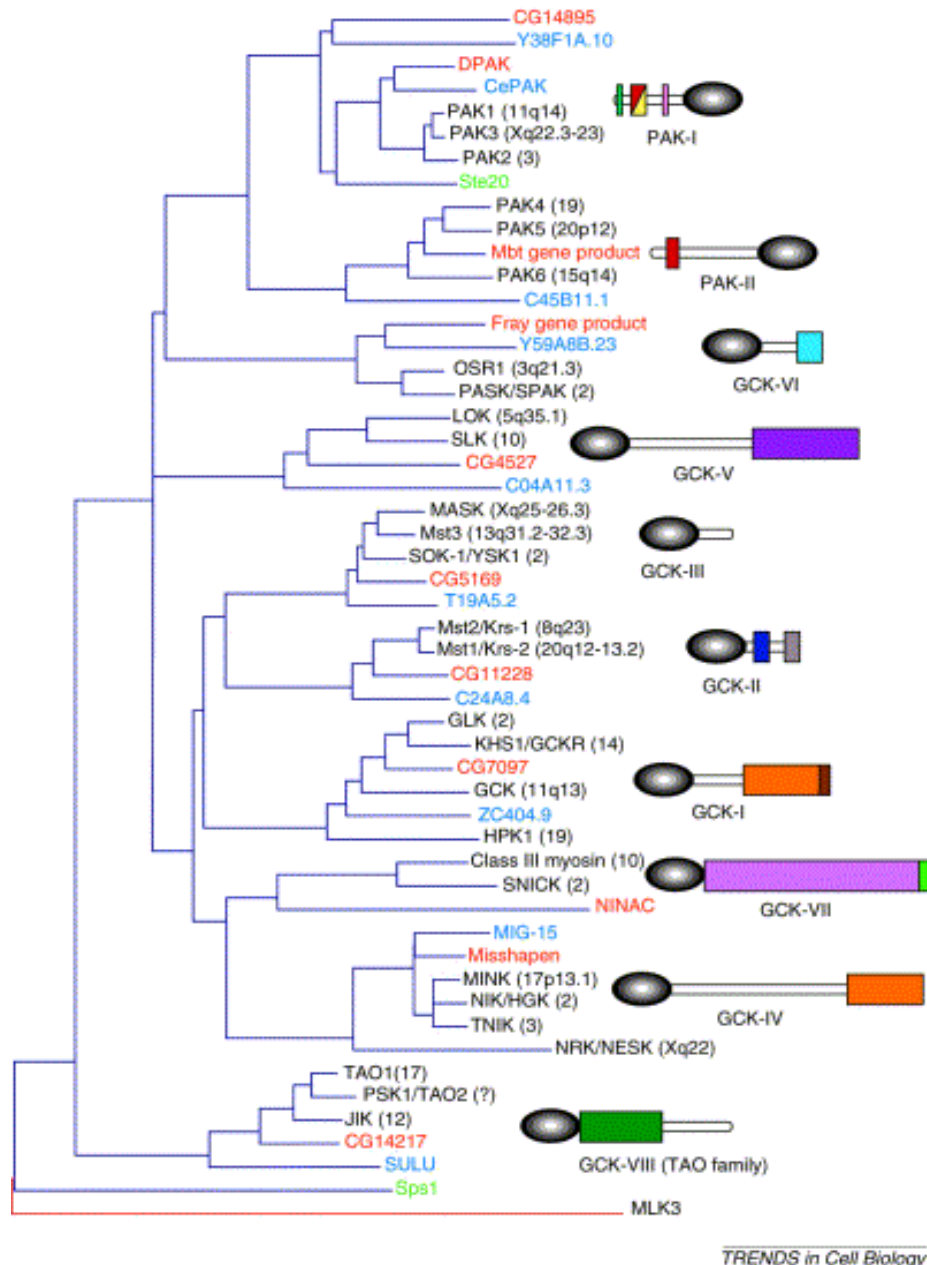


Figura 7.-Clasificación filogenética de las proteínas Ste20. En negro aparecen las quinasas existentes en humanos así como su localización cromosómica; en rojo los ortólogos de *Drosophila* y en azul los de *C. elegans*. Dan et al, 2001. *Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades*.

2.1 Subfamilia PAK-I.

Las Ste20 incluidas en la subfamilia PAK-I se ha visto que participan en la regulación de la actividad de las MAPK, concretamente, para PAK1 y PAK2 el mecanismo de cómo controlan esta ruta está bastante bien caracterizado. PAK2 es activada por las GTPasas Rac1 o Cdc42 que se unen a sus secuencias de reconocimiento

conservadas en la familia PAK y a su vez activa por fosforilación directa a Raf-1 (MAP3K) tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta activación de Raf-1 no se produce con la sobreexpresión de un mutante sin actividad quinasa de PAK2 (Sun et al, 2000). Con respecto a PAK1 la situación es diferente. PAK1 puede fosforilar a MEK1 (una MAP2K) en su residuo de Ser298. Esta fosforilación de MEK1 es importante para que pueda unirse a Raf1, la MAP3K que la activa (Jeffrey et al, 1997). Por lo tanto se puede decir que PAK2 actúa como una MAP4K pero PAK1 parece actuar más bien como una MAP3K.

Uno de los aspectos en el que están implicados los miembros de esta subfamilia es la regulación de la muerte/supervivencia celular. PAK2 es activado mediante corte por caspasas durante la apoptosis inducida por el ligando de Fas y TNF- α . El dominio quinasa C-terminal participa en la formación de cuerpos apoptóticos (Rudel et al, 1997). Por otro lado PAK1 promueve la supervivencia celular en respuesta a IL-3. En respuesta al tratamiento con IL-3 PAK1 fosforila a la proteína proapoptótica Bad, que en ausencia de tratamiento mantiene inactivas a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L interaccionando con ellas. Una vez fosforilado Bad libera a Bcl-2 y Bcl-x_L que pueden ejercer su función antiapoptótica (Schurmann et al, 2000). También se ha demostrado que PAK1 actúa o está implicado en la supervivencia inducida por Akt.

2.2 Subfamilia PAK-II.

Las quinasas incluídas en esta subfamilia, PAK4, PAK5 y PAK6 están implicadas en la reorganización del citoesqueleto celular, concretamente en el citoesqueleto de actina. Su activación es diferente a la de los miembros de la subfamilia PAK-I, no depende de la unión de GTPasas de la familia Rho. Si bien es cierto que Cdc42 puede unirse a PAK4 pero lo que provoca no es su activación, si no su traslocación al aparato de Golgi dónde interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina y promueve la formación de filopodios (Abo et al, 1998). Estudios realizados en *Drosophila* donde se inhibió la expresión del gen del homólogo a las quinasas de la subfamilia PAK-II, revelan que estas pueden estar implicadas en la morfogénesis neuronal, ya que el mutante inducido en *Drosophila* tiene graves defectos en la estructura del sistema nervioso central (Melzing et al, 1998).

2.3 Subfamilia GCK-I y GCK- IV.

Los miembros de estas dos subfamilias se ha visto que también están implicados o participan en la regulación de las MAPK. Concretamente hay dos quinasas de la subfamilia GCK-I que fosforilan a una MAP3K *in vitro*. De hecho, la primera evidencia de la existencia de MAP4K en mamíferos se descubrió con el miembro de la subfamilia GCK-I HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*) que activa a MEKK1 y MLK3 (MAP3K) activando preferentemente la vía de JNK. Otro miembro de esta subfamilia capaz de activar una MAP3K es GLK (Diener et al, 1997). Se ha demostrado que ambas quinasas, HPK1 y GLK pueden activar la ruta de JNK en respuesta a TNF. Lo curioso o sorprendente, es que esta activación permanece cuando se sobreexpresan mutantes de HPK1 o de GLK sin actividad quinasa. Esto hace pensar en dos posibilidades, o bien que estos mutantes homodimericen con formas intracelulares que sí poseen actividad quinasa y estas formas endógenas sean las encargadas de llevar a cabo la fosforilación de las MAP3K, o bien que no activen a MEKK1 por fosforilación directa, si no que solamente sea necesaria su unión a MEKK1 para que ésta pueda activarse (Diener et al, Jeffrey et al, 1997; Yuasa et al, 1998). Algo similar sucede con los miembros de la subfamilia GCK-IV NIK (*Nck-interacting kinase*)/HGK (*hepatocyte progenitor kinase-like/germinal center kinase-like kinase*), TNIK (*Traf2- and Nck-interacting kinase*) y MINK (*Misshapen/NIKs-related kinase*) (Su et al, 1997; Fu et al, 1999; Dan et al, 2000).

Otros estudios han demostrado que esto puede ser posible porque algunas MAP3K pueden activarse sin ser fosforiladas por ninguna otra proteína, si no que pueden autofosforilarse o homodimerizar y producirse fosforilaciones intermoleculares que las activen. En este caso, el papel de las Ste20 que actúan como hipotéticas MAP4K (aunque sin actividad quinasa realmente) sería el de estabilizar o promover la formación de estas estructuras donde varias MAP3K están unidas para poder activarse. En caso de que esto ocurra así, no queda claro cuál es la función de la actividad catalítica de las Ste20 de estas dos subfamilias como MAP4K. En este sentido se realizó un estudio que parece indicar que esta actividad puede promover la autofosforilación de la MAP4K y aumentar su afinidad por las MAP3K. De hecho, el mutante sin actividad quinasa de GCK aunque se une a MEKK1 lo hace de manera más débil que la proteína sin mutar. Además la activación de JNK por la forma mutada de GCK es también menor que la inducida por la forma sin mutar (Yuasa et al, 1998).

Llegados a este punto, y teniendo en cuenta que el concepto de MAP4K es relativamente nuevo y todavía no está totalmente establecido, hay que puntualizar que en el sentido estricto, sobre todo si tenemos en cuenta la definición de que una MAP3K es una quinasa que activa por fosforilación directa a una MAP2K y que esta activa por fosforilación directa a una MAPK, las Ste20 de las subfamilias GCK-I y GCK-IV no podrían considerarse MAP4K. Sin embargo podemos considerarlas MAP4K si decimos que una MAP4K es una quinasa implicada en la activación de la ruta de las MAPK por interacción con una MAP3K.

Con respecto a los miembros de la subfamilia GCK-IV también se ha descrito su implicación en procesos de muerte celular, se ha demostrado su implicación en la regulación de la supervivencia en linfocitos T y en células del sistema sanguíneo. Durante la apoptosis inducida por el ligando de Fas, la caspasa 3 corta a HPK1 liberando el dominio quinasa N-terminal que al carecer del dominio regulador es catalíticamente más activo, lo que potencia la activación de la ruta de JNK (Arnold et al, 2007; Chen et al, 1999; Shui et al, 2007).

Los miembros de la subfamilia GCK-IV NIK/HGK, TNIK y MINK se ha demostrado que también participan en la estructuración del citoesqueleto de actina interaccionando con proteínas adaptadoras de la familia Src a través de su dominio rico en residuos de prolina altamente conservado (Fu et al, 1999; Nicke et al, 2005; Su et al, 1999).

2.4. Subfamilias GCK-II y GCK-III. Quinasas Mst.

Dentro de la denominación de quinasas Mst suelen incluirse las proteínas de las subfamilias GCK-II y GCK-III de las Ste 20. Esto es debido al hecho de que cuatro de las cinco quinasas de vertebrados incluidas en estas subfamilias se denominan bajo el acrónimo Mst (*Mammalian Ste20 like kinases*). El hecho de que todas las Msts compartan aspectos funcionales, estructurales y bioquímicos contribuye a que se engloben bajo la misma denominación.

Como todos los miembros de la familia GCK poseen un dominio catalítico o dominio quinasa en el extremo N-terminal que guarda una homología relativamente alta entre los diferentes miembros del grupo y un dominio regulador en el extremo C-

terminal que difiere mucho entre unas y otras. Se piensa que esta diferencia en el dominio regulador podría ser lo que determine la especificidad de función en cada una de ellas.

Dentro de estas dos subfamilias se encuentran según la actual clasificación de las Ste20 cinco quinasas de humanos y otros vertebrados además de los ortólogos en *Drosophila melanogaster* y en *Caenorhabditis elegans*.

En la subfamilia GCK-II se engloban Mst1/krs2 (*kinase responsive to stress 2*) y Mst2/Krs1 (*kinase responsive to stress 1*) de humanos y vertebrados, el ortólogo de *D. melanogaster* Hippo y el ortólogo de *C. elegans* C24A8.4 (**figura 8**).

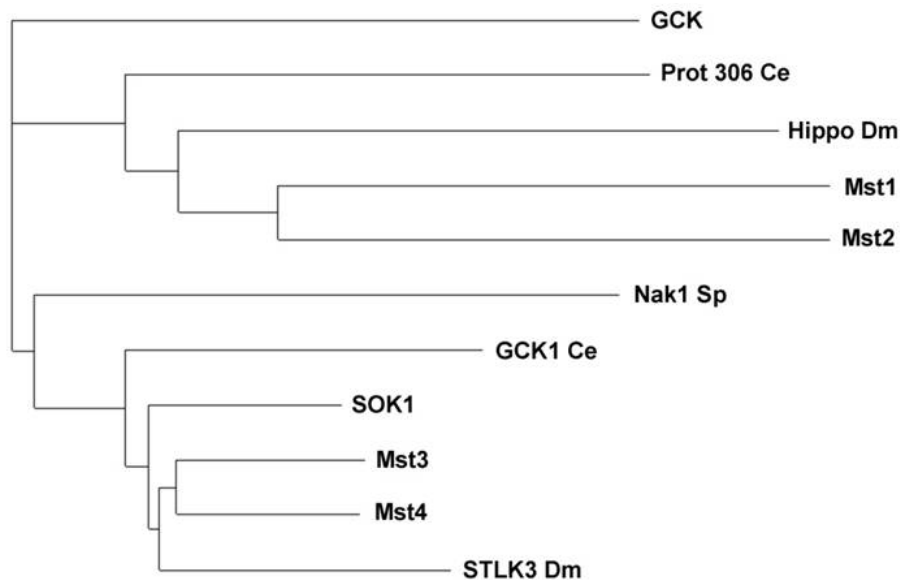


Figura 8.-Relación filogenética entre los miembros de las subfamilias GCK-II y GCK-III de las Ste20. Se muestran las quinasas de humanos, los ortólogos de *Drosophila melanogaster* (Dm) y los de *Caenorhabditis elegans* (Ce). (Pombo et al, 2007. *The GCK II and III subfamilies of the Ste20 group kinases*).

En la subfamilia GCK-III están incluidas Mst3, Mst4/MASK (Mst3 and SOK1-related kinase) y SOK1(Ste20/oxidant stress response kinase)/YSK1 (Yeast Sps1/Ste20 related kinase) de humanos y algunos vertebrados los ortólogos STLK3/CG5169 de *D. melanogaster* y GCK1 de *C. elegans* (**figura 8**). Hay otras proteínas de otros organismos relativamente próximos a esta subfamilia, concretamente la proteína severin

kinase de *Dictyostelium discoideum*, Nak1/Orb3 de *Saccharomyces pombe* y Kic1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4.1 Mst1. Mst1 es como todas las Ste20 una serina/treonina quinasa, tiene 487 aminoácidos y un peso molecular de 63 KDa. Es la más estudiada de todas las quinasas Mst y para la que se han descrito un mayor número de implicaciones biológicas y la participación en un gran número de procesos o mecanismos de señalización celular.

Como el resto de las quinasas Mst, Mst1 puede autofosforilarse por lo menos *in vitro*, en el bucle T o bucle de activación (*T loop*). Su fosforilación parece provocar cambios conformacionales en la proteína que deja más accesible el dominio catalítico para la interacción con los sustratos. Sin embargo, en el caso de Mst1 no está claro que estímulo es responsable de esta autofosforilación, ni su significado sobre la actividad de la quinasa, ya que en ocasiones los datos son contradictorios. La fosforilación de la serina 327 (que se encuentra en el bucle de activación) aumenta la actividad de la quinasa, aunque no aumenta su actividad sobre sustratos exógenos. En lo que sí parece estar implicada esta fosforilación es en la inhibición de la susceptibilidad de Mst1 a ser cortada por caspasas (Graves et al, 2001). Estudios posteriores intentaron localizar todos los lugares de fosforilación de Mst1, considerando la posibilidad de que puedan ser cuatro. Demostraron la existencia de dos residuos que no se encuentran en el bucle de activación, Thr-183 y Thr-187, cuya fosforilación parece ser fundamental para la activación de la quinasa. Comprobaron además que la autofosforilación del residuo Thr-183 tiene lugar de manera intermolecular una vez que se establecen o se forman los dímeros de Mst1 (Glantschnig et al, 2002).

La posibilidad de formar dímeros es otro aspecto clave en la regulación de la actividad de este grupo de quinasas. En el caso de Mst1 esta dimerización parece estar implicada en aspectos como la actividad quinasa o la localización de la proteína en el citoplasma (Lee et al, 2002). La dimerización tiene lugar gracias a la existencia de una región con estructura secundaria hélice α localizada en los 56 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína y que se denominó dominio SARA (Sav/Rassf/Hpo) (Scheel et al, 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, Mst1 puede ser cortada por caspasas, aspecto que también juega un papel de gran relevancia en la regulación de la actividad de todo este grupo de proteínas. De hecho, hay trabajos que mantienen la hipótesis de que Mst1 sólo está activada cuando se encuentra a la vez fosforilada y cortada, indicando que parece haber una relación muy estrecha entre ambos procesos, fosforilación y proteólisis por caspasas (Graves et al, 2001). La primera evidencia del corte por caspasas de Mst1 la publicaron dos grupos de investigación en el año 1998 al localizar una banda en un gel de 26 KDa que reaccionaba específicamente con el anticuerpo de Mst1. En estos trabajos localizaron el lugar de corte en la secuencia comprendida entre los aminoácidos 323 y 327 DEMD³²⁶S. Estudios de mutagénesis permitieron localizar el punto exacto de corte en el ácido aspártico de la posición 326 (Graves et al, 1998; Lee et al, 1998). Posteriormente se localizó un segundo lugar de corte entre la secuencia de aminoácidos TMTD³⁴⁹G. El lugar exacto del corte se identificó en el ácido aspártico de la posición 349. Este corte da lugar a una banda de 46 KDa. Estudios de mutagénesis permitieron confirmar que estos dos sitios de corte presentan diferente susceptibilidad de ser cortados por diferentes caspasas. Si bien el corte en el aminoácidos 326 lo producen las caspasas 3 y 9, el de la posición 349 lo producen las caspasas 6 y 7. No está totalmente claro el significado de la existencia de estos dos sitios de corte. Teniendo en cuenta que el corte en ambos lugares lo realizan diferentes caspasas, puede pensarse que uno u otro corte dependan de qué tipo de caspasas estén activadas en función del estímulo que provoque esta activación (Graves et al, 2001).

Tal como ocurre con la dimerización, que parece estar implicada en la retención de Mst1 en el citoplasma, el corte de la proteína también influye en la localización de la quinasa. En la secuencia de aminoácidos de Mst1 se identificaron dos señales de exportación nuclear (NES) en el dominio C-terminal. También se identificó una señal de localización nuclear (NLS) (Lee et al, 2002). Cuando las caspasas cortan a Mst1 separan las señales de exportación nuclear, esto debe ir acompañado de un cambio de conformación en la proteína que deje más expuesta la señal de localización nuclear y ésta pasa a ser funcional. Por eso una vez cortada, el extremo catalítico N-terminal de Mst1 se localiza en el núcleo de la célula (Ura et al, 2004).

Como ocurre con todas las quinasas del grupo, no se sabe exactamente cuál es el papel o la relevancia fisiológica de Mst1. Se ha demostrado que se activa en respuesta a un estímulo fisiológico, que es en respuesta a Fas (Graves et al, 1998). También se ha

demostrado su activación en respuesta a varios tipos de estrés extremo como el ácido askorbico (OA), choque térmico, arsenato sódico y estaurosporina (Taylor et al, 1996). Además, hay trabajos donde se demuestra la activación de Mst1 en respuesta a estrés oxidativo, concretamente a peróxido de hidrógeno. Uno de estos trabajos es del año 1998, y en él demuestran que la forma de Mst1 cortada en el residuo de ácido aspártico de la posición 326 se activa en respuesta a peróxido de hidrógeno en células de leucemia humana HL-60 (Takeya et al, 1998). Otro es del año 2006 y muestra como Mst1 media la respuesta a estrés oxidativo a través de una ruta de señalización en la que está implicado el factor de transcripción FOXO (Lehtinen et al, 2006).

En cuanto a la activación de vías de señalización celular, se ha descrito que Mst1 no activa la vía de ERK pero que sí puede activar tanto la ruta de JNK como la ruta de p38. Esta activación tiene lugar a través de la MAP3K MEKK1 y a través de las MAP2K MKK7 en el caso de JNK y MKK6 en el caso de p38 (Graves et al, 2001). Sin embargo no existen evidencias de que Mst1 pueda ejercer una fosforilación directa de una MAP3K. Según esto, podemos considerar a Mst1 como una MAP4K dependiendo de lo estrictos que seamos a la hora de aplicar el término MAP4K como ya se mencionó anteriormente.

Hay muchos más trabajos que implican la participación de Mst1 en muerte celular, concretamente en apoptosis. La sobreexpresión de Mst1 provoca condensación nuclear en células BJAB, en células 293T y también en células COS-1 (Graves et al, 2001; Sung et al, 2003; Ura et al, 2004). El mecanismo de acción en el que está implicada esta quinasa parece empezar con la activación de las caspasas en respuesta a un estímulo apoptótico que cortan a Mst1. El extremo catalítico N-terminal puede ejercer un mecanismo de retroalimentación positiva actuando sobre las caspasas inactivas y activándolas de manera que se amplifica la señal apoptótica (Graves et al, 1998; Lee et al, 1998). Por otro lado el extremo N-terminal activa las rutas de JNK y p38 que inducirán la activación de factores de transcripción relacionados con la muerte de la célula. Existe una tercera función para el extremo N-terminal en el núcleo. En el año 2003 se publicó un trabajo donde identificaban la histona H2B como un sustrato de Mst1. La fosforilación de esta histona es necesaria para que pueda producirse la compactación que tiene lugar en la cromatina en respuesta a estímulos apoptóticos. Concretamente, Mst1 puede fosforilar a la histona H2B en su residuo de serina de la posición 14 (Cheung et al, 2003). El mismo grupo, dos años más tarde, publicó otro

trabajo donde ampliaban el estudio y comprobaban que en levaduras, y en respuesta a peróxido de hidrógeno la encargada de fosforilar la histona H2B (en la serina de la posición 10) es Ste20. Esto demuestra que la fosforilación de esta histona es un proceso muy conservado en la evolución, algo totalmente lógico si tenemos en cuenta que controla un proceso tan importante como la apoptosis (Ahn et al, 2005).

Recientemente se ha descrito otro mecanismo de acción muy conservado a través de la evolución mediante el cual Mst1 puede regular aspectos relacionados con la viabilidad celular en respuesta a estrés oxidativo, en cultivos primarios de neuronas, o la longevidad, en organismos menos evolucionados como los nematodos. Este control lo realiza Mst1 regulando o variando la actividad del factor de transcripción FOXO. Este factor de transcripción está implicado en el control de la adaptación/muerte celular en organismos superiores y posee un ortólogo en nematodos DAF-16 que controla la longevidad de estos organismos (Lehtinen et al, 2006). Las proteínas de la familia FOXO, así como su ortólogo en nematodos, están reguladas también por factores de crecimiento, como por ejemplo el factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF) a través de la vía PI3K-Akt. Esta vía está conservada desde nematodos hasta mamíferos (Kenyon, 2005; Van Der Heide et al, 2004)

El tratamiento con peróxido de hidrógeno activa a Mst1 en cultivos neuronales. Esta activación provoca la fosforilación de FOXO3, lo que provoca que se disocie de la proteína 14.3.3 ζ y pueda entrar en el núcleo celular e inducir la transcripción de genes implicados en la muerte celular.

El ortólogo de Mst1 en nematodos es CST-1. Se comprobó que CST-1 también puede fosforilar al ortólogo de FOXO en estos organismos, que es DAF-16 en el residuo de serina equivalente al de la posición 207 de FOXO3. DAF-16 interviene en el control del tiempo de vida de los nematodos en respuesta a insulina variando la expresión de determinados genes. Los niveles de CST-1 en nematodos están relacionados con su tiempo de vida, ya que la inhibición de la expresión de esta quinasa acelera el envejecimiento y la sobreexpresión aumenta la esperanza de vida en estos organismos. Se comprobó que los efectos de CST-1 sobre el tiempo de vida de estos organismos están mediados por DAF-16 ya que no se observan en nematodos donde se inhibe la expresión de este factor de transcripción. Los datos de este trabajo indican que CST-1 funciona en paralelo con la vía de señalización en respuesta a la insulina, regulando el

tiempo de vida de los nematodos a través del factor de transcripción DAF-16 (Lehtinen et al, 2006).

Se han encontrado otras proteínas que interaccionan con Mst1 y que son importantes para la inducción de muerte por parte de ésta. Es el caso de la proteína asociada a la muerte celular DAP4 (*death-associated protein*). Se cree que esta interacción es la responsable de una nueva ruta a través de la cuál Mst1 induce muerte celular. DAP4 se une al mismo tiempo a Mst1 y a p53 haciendo que ambas colocalicen, de forma que se ve potenciado el efecto proapoptótico de p53 (Lin et al, 2002).

Otra proteína que parece ser regulada por Mst1 es el inhibidor de la DNasa activada por caspasas ICAD (*Inhibitor of caspase-activated DNase*). Esta proteína se encuentra unida a la DNasa CAD (*caspase associated DNase*) de manera que ésta última se encuentra inhibida y no puede fragmentar el ADN. Una vez activadas las caspasas, cortan el complejo ICAD-CAD, y la DNasa pasa a ser funcional. El corte por caspasas de este complejo es necesario para que Mst1 pueda inducir muerte celular ya que la sobreexpresión de una forma mutada que no permite la activación proteolíticamente de CAD inhibe la muerte que Mst1 induce (Ura et al, 2001).

2.4.2 Mst2. Con respecto a su regulación por fosforilación, Mst2 también puede autofosforilarse por lo menos *in vitro*, y esta autofosforilación provoca un aumento de su actividad quinasas. Se desconoce cuáles son los mecanismos que pueden provocar o promover esta autofosforilación *in vivo*. Se ha demostrado que esta fosforilación depende únicamente del residuo de treonina de la posición 180. La autofosforilación de Mst2 es un proceso que depende en gran medida de su concentración o de sus niveles en la célula, lo que es un indicio de que puede tener lugar de manera intermolecular. Mst2 al igual que Mst1 también posee un lugar de corte para la caspasa 3, y ser cortada provoca un aumento de su fosforilación además de influir en su susceptibilidad para ser defosforilada. El lugar de proteólisis por caspasas en Mst2 se encuentra en la secuencia de aminoácidos comprendida entre el ácido aspártico de la posición 304 y la serina de la posición 308 DELD³⁰⁷S. Concretamente el corte se produce en el residuo de ácido aspártico de la posición 307. Aunque pueden autofosforilarse tanto la forma entera como la forma cortada de la proteína existen diferencias entre ambas formas en cuanto a la susceptibilidad para ser defosforiladas por fosfatasa. Mientras que la forma entera es

rápidamente defosforilada por la fosfatasa 1 o la fosfatasa 2A, la forma cortada es mucho más resistente a la defosforilación (Deng et al, 2003).

Se activa en respuesta a los mismos estímulos que provocan la activación de Mst1, inhibidor de la fosfatasa 2A y estímulos relacionados con formas extremas de estrés como el ácido okadaico (OA), choque térmico, arsenato sódico y estaurosporina (Taylor et al, 1996).

Al igual que sucede con Mst1, la sobreexpresión de Mst2 provoca apoptosis. Efecto que parece estar regulado por su interacción con Raf-1. Raf-1, al interaccionar con Mst2 promueve la disociación de sus dímeros inhibiendo su fosforilación y en consecuencia la muerte inducida por la quinasa (Deng et al, 2003). Hay un estudio que confirma esta teoría. En fibroblastos que no expresan Raf-1 (Raf-1^{-/-}) y que son especialmente sensibles a la muerte a pesar de que la ruta de ERK está perfectamente regulada. Esto indica que la susceptibilidad de estas células a sufrir apoptosis está mediada por otra ruta. Esta ruta parece estar controlada a parte de por Raf-1 por Mst2, ya que estos fibroblastos se hacen más resistentes a apoptosis al disminuir los niveles de Mst2 mediante shARN. Esto se confirma con el hecho de que al inhibir la expresión de Raf-1 en células Raf-1^{+/+} tanto de ratón como humanas, Mst2 se encuentra activada y las células sufren apoptosis (O'Neil et al, 2004).

2.4.3 Mst3. La mayoría de los conocimientos que se tienen acerca de Mst3 están relacionados con su regulación por parte de las caspasas y su localización celular.

Mst3 también puede autofosforilarse *in vitro*. Sin embargo no se tiene conocimiento de los residuos implicados o responsables de esta autofosforilación.

Es susceptible de ser cortada por caspasas, lo que provoca un incremento de hasta 10 veces en su actividad quinasa. El lugar exacto del corte fue localizado en el ácido aspártico de la posición 313 que se encuentra en la secuencia AETD³¹³G (Huang et al, 2002). Al igual que en Mst1, en Mst3 se localizó una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal de su dominio catalítico y una señal de exclusión celular (NES) en el dominio regulador de la quinasa. La NLS es la responsable de que la forma cortada de la quinasa se localice en el núcleo de la célula. La sobreexpresión de Mst3 tanto entera como la forma cortada provoca muerte en la línea celular HEK293

con características de apoptosis. Esta muerte es dependiente de la actividad quinasa de Mst3. (Huang et al, 2002; Lee et al, 2005).

En cuanto a la activación de las MAPK por Mst3 hay datos contradictorios. En el año 1997 se publicó que Mst3 no activa ninguna de las rutas de las MAPK (Schinkmann et al, 1997). En el año 2000 se publicó un trabajo donde muestran que la sobreexpresión de Mst3 en células HEK 293 provoca la activación de la ruta de ERK. En este mismo trabajo de muestran la existencia de una isoforma de la quinasa existente en cerebro y que denominaron Mst3b que también puede activar la ruta de ERK. Mst3b es regulada negativamente por la proteína quinasa A (PKA) (Zhou et al, 2000).

2.4.4 Mst4/MASK. La Ste20 Mst4 se clonó y describió por primera vez al encontrarse en una búsqueda para proteínas que interaccionan con Raf-1. Está compuesta por 416 aminoácidos y pesa 46 KDa. En el mismo trabajo comprobaron que se expresa sobre todo en placenta, timo y leucocitos de sangre periférica. Un año más tarde la misma proteína fue descrita por un grupo independiente y la denominaron MASK (*Mst3 and SOK1-related kinase*) (Quian et al, 2001). En este trabajo también estudiaron los niveles de expresión de la proteína con resultados idénticos al trabajo anterior (Dan et al, 2002).

Se sabe que también puede autofosforilarse por lo menos *in vitro* ya que posee actividad quinasa sobre un sustrato externo como la MBP (*myelin basic protein*) pero no se conocen los aminoácidos implicados en esta autofosforilación. Al igual que Mst1 puede dimerizar por su extremo C-terminal y parece ser que esta dimerización está relacionada con su estado de activación. También demostraron que un mutante sin el extremo regulador C-terminal posee mayor actividad quinasa sobre la MBP, lo que significa que este extremo regula negativamente la actividad de la proteína (Dan et al, 2002).

Con respecto a la rotura proteolítica de la quinasa mediante caspasas los datos son contradictorios. Mientras dos grupos mantienen que las caspasas no cortan a Mst4 a pesar de poseer una hipotética secuencia de corte muy similar a la de Mst2 (Mst4-DESDS, Mst2-DELDS) (Huang et al, 2002; Lin et al, 2001), otro grupo dice que puede ser cortada parcialmente por lo menos por la caspasa 3, y postulan que quizás algún

mecanismo de regulación, como la homodimerización, proteja a la proteína de este corte (Dan et al, 2002).

Con respecto a los estímulos que provocan su activación, Mst4 es la única de las Mst quinasas que se activa en respuesta a factores de crecimiento, concretamente se activa en respuesta a EGF por lo menos en tres líneas celulares derivadas de tumor de próstata LNCaP, DU 145 y PC-3 (Sung et al, 2003).

Aunque como se ha mencionado con anterioridad Mst4 fue clonada gracias a una búsqueda de proteínas que pudieran interaccionar con Raf-1, los autores del artículo nunca pudieron demostrar que esta interacción se produjera realmente en células de mamífero y propusieron que la regulación de las MAPK por Mst4 puede ser un hecho dependiente del tipo de célula o del tipo de tejido (Quian et al, 2001). En el mismo año, el mismo grupo demostró la sobreexpresión de Mst4 en células Phoenix provoca la activación de ERK pero no de JNK ni de p38 de forma independiente de Ras y Raf (Lin et al, 2001).

Para Mst4 también se publicaron datos que la relacionan con la muerte celular. La sobreexpresión de la proteína entera como de un mutante que no posee el dominio regulador, provocan muerte celular en la línea de tumor de mama MCF-7 (Dan et al, 2002). Para Mst4 también se describió un papel en la proliferación celular y en la progresión tumoral. En primer lugar se publicó que la sobreexpresión de Mst4 en células Phoenix provoca un aumento de la proliferación de éstas así como la posibilidad de crecimiento independiente de anclaje (Lin et al, 2001). Dos años más tarde un nuevo trabajo apoyaba estos datos diciendo que Mst4 altera la morfología y posibilita el crecimiento independiente de anclaje en células de tumor de próstata y que favorece el crecimiento de tumores trasplantados a través de la vía de ERK (Sung et al, 2003).

2.4.5. SOK1/YSK1. Fue descrita por primera vez hace diez años por dos grupos independientes. Comparte algunas características con los otros miembros del grupo como la capacidad de autofosforilación, la inhibición de su actividad catalítica por parte del dominio regulador C-terminal, activarse en respuesta a estrés y comparte específicamente con Mst4 la localización en el aparato de golgi.

i) Clonación SOK1/YSK1. Fue clonada y descrita por primera vez por en dos trabajos realizados por grupos independientes, el trabajo de Pombo y colaboradores, y el trabajo de Osada y colaboradores, en los años 1996 y 1997 respectivamente.

En el trabajo de Pombo y colaboradores la proteína se clonó utilizando oligonucleótidos degenerados para secuencias de ADN que se encuentran altamente conservadas en los subdominios II y VI de las serina/treonina quinasas MEKK. Se utilizó para la obtención del ADNc ARN de placenta humana. Se analizó la secuencia de todos los productos obtenidos y se vio que uno de ellos parecía codificar una proteína que no estaba descrita hasta el momento y se utilizó para sondear una librería de ADNc de células B humanas. Se aislaron dos clones pero solamente uno, de 2Kb poseía una secuencia Kozac (gcggccatgg), un codón de terminación y una cola de poliA. A la proteína codificada por este clon se le denominó SOK1 (*Ste20/oxidant stress response kinase*) en función del tipo de estrés que la activa. En este mismo trabajo se publican los niveles de expresión de la quinasa en diferentes tejidos de rata siendo en orden decreciente: testículo, estómago, intestino grueso, cerebro, pulmón, corazón, riñón, intestino delgado e hígado (Pombo et al, 1996).

En el trabajo de Osada y colaboradores utilizaron oligonucleótidos degenerados para secuencias conservadas en algunos de los dominios de las MAP3K de levaduras (Ste11, Bck1 y Byr2). Utilizando estos oligonucleótidos consiguieron aislar mediante PCR (*polymerase chain reaction*) varios fragmentos de ADNc con los que hicieron un sondeo de una librería de células HeLa. La utilización de estos fragmentos dio como resultado en este sondeo el aislamiento de un ADNc que codificaba una proteína que compartía una gran homología con Ste20 y con la proteína de levaduras Sps1. Basándose en este parecido la denominaron YSK1 (*Yeast Sps1/Ste20-related Kinase 1*) (Osada et al, 1997).

ii) Estructura de SOK1. La ORF (*open reading frame*) de SOK1 codifica una proteína de 426 aminoácidos y un peso de 48 KDa. Posee los once subdominios característicos de las serina/treonina quinasas. Como el resto de las quinasas de la familia GCK está constituida por un dominio quinasa o catalítico situado en su extremo N-terminal que comprende el aminoácido 20 al 270. En este dominio se localizan en la lisina de la posición 59 el lugar de unión para el ATP necesario para que la proteína tenga actividad catalítica y en la treonina de la posición 180 el bucle de activación

necesario para que la proteína se active y deje accesible el lugar de unión a sustratos. El dominio regulador comprende del aminoácido 271 al 426. En este dominio se encuentran, entre los aminoácidos 275 y 291 (KKTSFLTELIDRYKRWK) una región homóloga a la señal de localización nuclear (NLS) de Mst3 y una región homóloga (CLSTLVRPVFGELK) a la señal de exportación nuclear (NES) de ésta misma (**figura 9**). Sin embargo, al inicio de este trabajo, no contábamos con datos que pudieran avalar la funcionalidad de estas dos señales en SOK1.

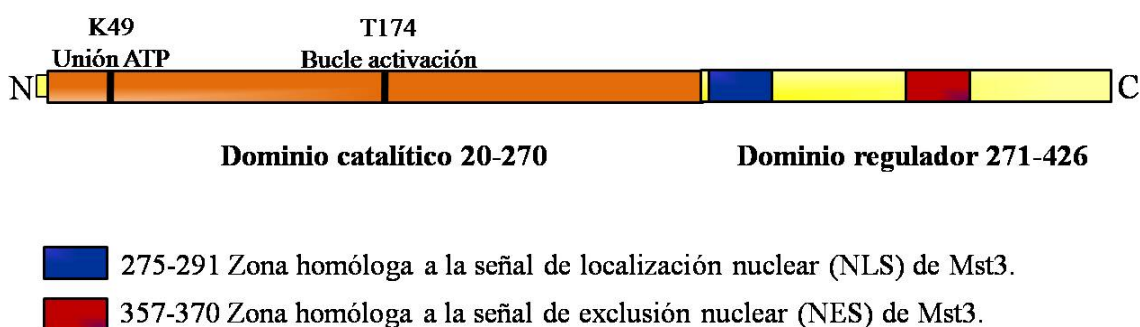


Figura 9.-Estructura de SOK1. SOK1 está constituida por el dominio quinasa N-terminal dónde se encuentran el lugar de unión del ATP y el bucle de activación, y un dominio regulador C-terminal en el que se encuentran una región homóloga a la señal de localización nuclear (NLS) y una región homóloga a la señal de exportación nuclear (NES) de Mst3.

iii) Actividad quinasa/regulación de SOK1. Al igual que el resto de las proteínas Mst SOK1 puede autofosforilarse *in vitro*. Esto se demostró mediante ensayos quinasa realizados con extractos de células en las que se había sobreexpresado e inmunoprecipitado SOK1. Estos extractos se incubaron en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y MBP durante 0 y 20 minutos. La fosforilación de la MBP aumenta tras 20 minutos de incubación, lo que significa que SOK1 puede autoactivarse y autofosforilarse. La fosforilación de la MBP disminuye en presencia de fosfatasa 2A. Se piensa que esta capacidad de autofosforilación de SOK1 supone un importante papel en su activación y en su regulación (Pombo et al, 1996)

El dominio regulador de SOK1 disminuye su actividad quinasa. Estos datos se verificaron mediante un ensayo de actividad quinasa realizado con extractos de células en las que se había sobreexpresado una forma cortada de SOK que no posee dominio regulador ($\Delta\text{C-SOK1}$) y viendo que la fosforilación de la MBP por parte de $\Delta\text{C-SOK1}$

es mayor que la fosforilación provocada por la proteína entera. Este fue el primer caso en que se caracterizó que el dominio regulador de una quinasa del grupo de las Ste20 puede regular negativamente su actividad (Pombo et al, 1996) aunque años más tarde se describió el mismo efecto en el caso de Mst4 (Dan et al, 2002).

Al igual que otras quinasas Mst, SOK1 se activa en respuesta a estrés celular, específicamente en respuesta a estrés oxidativo y anoxia química. La actividad de SOK1 no aumenta en respuesta a otros estímulos como choque térmico, variación de la osmolaridad del medio de cultivo, tratamiento con factores de crecimiento como EGF, PDGF, TNF α , activadores de las MAPK JNK y p38 como la anisomicina o antitumorales como el cisplatino (Pombo et al, 1996).

La actividad quinasa de SOK1 se ve incrementada en respuesta a estrés oxidativo, ya sea por tratamiento directo con especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno o favoreciendo la formación de éstas en la célula sometiendo químicamente los cultivos celulares a anoxia química. Para inducir este modelo de anoxia en los cultivos celulares se utilizan sustancias como el cianuro, la antinomicina A o la rotenona que alteran la cadena de transporte electrónico que tiene lugar en la mitocondria favoreciendo la formación de ROS en solitario o combinados con 2-deoxiglucosa que actúa como análogo de la glucosa provocando un descenso en los niveles de ATP de las células. En estas condiciones se comprobó que la actividad quinasa de SOK1 puede incrementarse hasta diez veces con respecto a los cultivos celulares no sometidos a anoxia química. Para verificar que son las ROS específicamente las que provocan la activación de SOK1 se hicieron los experimentos en presencia de sustancias de naturaleza antioxidante como el PDTC (*Pyrrolidinedithiocarbamate*), el piruvato sódico, el NDGA (*norhidroguaiaretic acid*) que impiden la formación de especies reactivas del oxígeno, o en presencia de catalasa que elimina el peróxido de hidrógeno viendo que en presencia de estas sustancias se revierte la activación de SOK1. Esto demuestra que SOK1 se activa en condiciones de anoxia y específicamente a través de los radicales libres generados a partir del oxígeno (Pombo et al, 1997).

El aumento de la concentración intracelular de calcio producida por la liberación de éste del retículo endoplasmático es una consecuencia del estrés oxidativo y de la anoxia química. Teniendo en cuenta este hecho, se bloqueó la liberación de calcio del

retículo endoplasmático con BAPTA-AM o EGTA, para estudiar la relación existente entre este aumento de calcio y la activación de SOK1. En este sentido se llegó a la conclusión de que el incremento de calcio citoplasmático es necesario pero no suficiente para provocar esta activación. El hecho de que tengan que estar elevados los niveles de calcio en el citoplasma parece indicar que es un mecanismo de control para que SOK1 solamente se active si el daño por estrés oxidativo es severo, ya que solo en estas condiciones se libera calcio del retículo endoplasmático (Pombo et al, 1997).

La interacción con la proteína de la matriz del aparato de Golgi GM130 provoca la activación de SOK1 debido a la fosforilación de la treonina del bucle de activación. Este es un aspecto que SOK1 comparte con Mst4 (Preisinger et al, 2004).

En cuanto a la regulación de la actividad de SOK1 mediante otros mecanismos como la dimerización o la rotura proteolítica por caspasas como ocurre en otras Msts hay muy pocos datos al respecto. Se sabe que SOK1 podría formar dímeros ya que presenta en su extremo C-terminal secuencias homólogas a las implicadas en la dimerización de Mst1, (Kyriakis, 1999; Preisinger et al, 2004). En cuanto a la posibilidad de que SOK1 sea cortada por caspasas no había datos publicados al respecto en el momento de iniciarse este trabajo.

iv) Funciones de SOK1. La anoxia química es un modelo que reproduce en cultivos celulares los procesos de isquemia que pueden sufrir los órganos o tejidos de un organismo cuando se ven privados de oxígeno por una interrupción del aporte sanguíneo. Los procesos de isquemia en sí mismos provocan la generación de especies reactivas del oxígeno, y más si van seguidos de reperfusión. Dependiendo de la gravedad del proceso suelen ir acompañados de la necrosis o la apoptosis de un gran número de las células afectadas. El hecho de que SOK1 se active en estas condiciones de estrés tan extremas, hizo que se pensara que esta activación podía estar relacionada con procesos implicados en el control de la viabilidad celular. Sin embargo, al inicio de este trabajo no había datos publicados que relacionaran a SOK1 con este tipo de procesos.

Teniendo en cuenta que muchas Ste20 en general y también algunas Msts en particular provocan la activación de las MAPK, y que además tanto la ruta de JNK como la de p38 se activan en respuesta al tipo de estímulo (isquemia-reperfusión/anoxia química) que también activa a SOK1, se pensó que SOK1 podría estar implicada en la

activación de estas rutas. Sin embargo no es así, SOK1 no activa ninguna de las rutas de las MAPK, lo que hizo pensar que puede formar parte de alguna ruta de señalización que aún no se haya descrito (Pombo et al, 1996).

En el año 2004 se publicó un trabajo en el que muestran la localización de SOK1 y Mst4 en el aparato de Golgi. Para esta localización es necesaria la presencia de GM130 y también es necesario que SOK1 y Mst4 sean catalíticamente activas ya que la unión de GM130 a estas proteínas parece promover su dimerización y provoca su activación. SOK1 es necesaria para que se mantenga la estructura del aparato de Golgi y su localización perinuclear ya que la inhibición de su expresión provoca la despolarización de éste. El mismo efecto se observa cuando se sobreexpresa un dominante negativo de SOK1 (con una mutación en la treonina del bucle de activación), lo que significa que tanto la presencia de SOK1 como su actividad quinasa son necesarias para mantener la estructura del aparato de Golgi (Preisinger et al, 2004).

En mismo estudio demuestran la implicación de SOK1 en procesos de migración celular mediados por la proteína 14.3.3 ζ que identificaron como un sustrato de SOK1. Recientemente se ha demostrado que la migración o invasión por parte de células de mamífero está relacionada con la vía oncogénica de señalización de Ras, y en esta migración está implicada la proteína gelsolina. También se ha comprobado que en la vía de señalización de Ras está implicado el aparato de Golgi (Bivona et al, 2003; Chiu et al, 2002; De Corte et al, 2002). Teniendo en cuenta estos datos que muestran la implicación del aparato de Golgi en la migración celular, y como SOK1 se encuentra, y es importante para la estructura de este orgánulo, en el trabajo de Preisinger y colaboradores estudiaron la posible relación entre SOK1 y 14.3.3 ζ con la capacidad de las células para invadir una matriz de colágeno. SOK1 fosforila a 14.3.3 ζ en su residuo de serina 58. Demuestran la implicación de ambas proteínas en este proceso ya que la sobreexpresión del dominante negativo de SOK1 (mutante T174A) así como del mutante 14.3.3 ζ^{S58A} además de despolarizar el golgi impiden la migración y polarización del centrosoma (Preisinger et al, 2004).

2.5 Subfamilia GCK-V.

En esta subfamilia se engloban dos miembros LOK (*lymphocyte-oriented kinase*) y SLK (*Ste20-like kinase*). De SLK se ha caracterizado su implicación en procesos de muerte celular. En la apoptosis inducida por el ligando de Fas, la caspasa 3 una vez activada corta a SLK dando lugar a dos péptidos con funciones diferentes. Por un lado, el péptido correspondiente al extremo catalítico N-terminal potencia la apoptosis activando más la vía de JNK. Por otro lado, el extremo C-terminal participa en la despolarización de las fibras de estrés (Sabourin et al, 1999; Sabourin et al, 2000), lo que parece afectar a la progresión del ciclo celular (O'Reilly et al, 2005).

2.6 Subfamilia GCK-VII.

Los conocimientos que se tienen acerca de las funciones de los miembros de esta subfamilia son indirectos. Se sabe que su ortólogo de *Drosophila* NIMAC, participa en el control de la fototransducción de señales en la retina (Bahler et al, 2000; Wes et al, 1999).

2.7 Subfamilia GCK-VIII (familia TAO).

Los miembros de esta subfamilia participan en la ruta de activación de las MAPK, concretamente activan la ruta de p38 actuando como MAP3K. Esta subfamilia la componen cuatro miembros, TAO1, TAO2, PSK1 (*prostate-derived STE20-like kinase*) y JIK (*JNK/SAPK-inhibitory kinase*). TAO1 y TAO2 activan la ruta de p38 fosforilando a MKK3 y a MKK4 y MKK7 respectivamente. PSK1 fosforila a MKK4 y MKK7 y activa la ruta de JNK. Para esta proteína se ha caracterizado otra función, ya que también parece estar implicada en la organización del citoesqueleto de actina. Se ha demostrado que su extremo regulador C-terminal provoca la ruptura de las fibras de estrés cuando se sobreexpresa tanto la proteína entera como sólo el extremo regulador (Moore et al, 2000). Por último JIK no ha podido demostrarse que active ninguna de las rutas de las MAPK, se cree que regula negativamente la actividad de JNK porque su activación disminuye la activación de JNK en respuesta a EGF. Con respecto a esta subfamilia, su clasificación aún no está clara. Están englobadas de momento dentro de

la familia GCK pero quizás lleguen a clasificarse como una familia distinta, la familia TAO, teniendo en cuenta criterios filogenéticos (que muestran que están más distanciados de los otros miembros de la familia GCK) y criterios funcionales (como es el hecho de que actúen como MAP3K estrictamente).

IV. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA MUERTE CELULAR.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han ayudado a la caracterización de muchos de los aspectos relacionados con la muerte celular. Es un proceso de gran importancia para el correcto desarrollo de los seres vivos, juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y también en la vida posnatal, sobre todo en los organismos más evolucionados. Sin embargo la muerte celular también es clave en numerosos procesos patológicos tales como la muerte de neuronas en enfermedades neurodegenerativas o la muerte de cardiomiocitos en enfermedades o problemas cardiovasculares. También es un proceso clave en situaciones como el crecimiento o desarrollo tumoral y es lo que tratan de promover, de manera selectiva para las células tumorales, muchos agentes quimioterapéuticos.

Las rutas de señalización juegan un papel fundamental en los procesos de muerte celular, ya que deben conducir la información desde el estímulo que provoca su activación, por ejemplo la existencia en la célula de ROS, hasta los efectores de la respuesta. La intensidad del estímulo, y también el tipo de célula determinan las rutas activadas y la intensidad de la activación. El efecto final dependerá del balance entre las diferentes vías de señalización activadas, ya que hay vías relacionadas mayoritariamente con promover la supervivencia de la célula, mientras que otras están más frecuentemente asociadas a la muerte (**figura 10**).

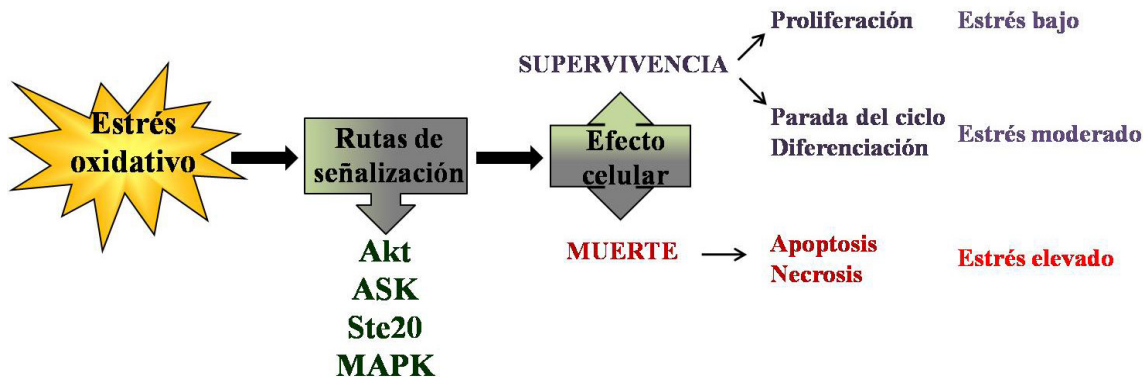


Figura 10.-Esquema del balance que realizan las células en respuesta a las diferentes rutas de señalización. Las células pueden sobrevivir o no en respuesta a estrés oxidativo gracias al balance neto o equilibrio de las diferentes rutas que este tipo de estrés activa. El tipo de efecto celular depende de la intensidad del estrés.

Como ya se ha comentado, normalmente, bajas concentraciones de ROS, o una leve variación en el potencial de oxido-reducción de la célula, tienen un efecto hiperproliferativo modulando a vía de ERK o de diferenciación celular. Variaciones moderadas en la concentración de ROS normalmente están asociadas con parada del ciclo celular y diferenciación, y por último cambios bruscos o elevadas concentraciones de especies de naturaleza oxidante provocan muerte celular sobre todo por apoptosis aunque también pueden provocar necrosis. La necrosis se produce cuando el estímulo oxidativo es muy intenso (Cai et al, 1998; Evens, 2004; Voehringer et al, 2000) (**figura 10**).

Tradicionalmente se acepta que existen dos tipos principales de muerte celular, la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis. Se desencadenan en respuesta a diferentes tipos de estímulos, si bien la apoptosis suele producirse en respuesta a estímulos fisiológicos la necrosis suele tener lugar como consecuencia de estímulos extremos.

Morfologicamente es relativamente fácil diferenciar una célula necrótica de una apoptótica. Las células en las que se desencadena la apoptosis suelen reducir su tamaño. El núcleo se compacta, efecto que fácilmente se detecta con tinciones para ácidos nucleicos como la bisbenzamida o Hoescht. La membrana plasmática se deforma formando vesículas pero no llega a romperse, es lo que se conoce como *membrane blebbing and shrinkage*. También a nivel de la membrana plasmática la fosfatidilserina pasa del interior al exterior de la membrana, efecto que se utiliza como criterio para

diferenciar necrosis de apoptosis. Por último la célula se fragmenta en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos. Por el contrario, en la necrosis las células se redondean y aumentan de tamaño. Ya en etapas muy tempranas del proceso, la célula se rompe liberando su contenido. Fisiológicamente este hecho posee gran relevancia ya que desencadena una respuesta inflamatoria afectando a las células vecinas, algo que no ocurre en la apoptosis. El hecho de que la membrana se rompa puede llevar a confusión a la hora de diferenciar entre células necróticas y apoptóticas en cultivo mediante tinción de la fosfatidilserina ya que puede teñirse la que se encuentra en la parte interna de la membrana porque ésta está rota. Una buena tinción diferencial basándose en la rotura de la membrana plasmática es la tinción con yoduro de propidio, este no puede teñir las células apoptóticas pero sí las necróticas (**tabla 1**).

En cuanto a las diferencias bioquímicas, en la necrosis se pierde el control de la homeostasis celular, sobretodo de la homeostasis iónica, y a diferencia de en la apoptosis el ADN se fragmenta o se degrada al azar (**tabla 1**).

Si bien esta visión tanto de la necrosis como de la apoptosis es la más aceptada tradicionalmente representa un poco la “situación ideal” o es un reflejo de situaciones extremas que pueden darse en cultivos celulares pero que raramente se dan en organismos vivos. Realmente lo que parece es que en situaciones fisiológicas ambos procesos no son tan diferentes o las diferencias no son tan grandes. Si bien la necrosis se produce en respuesta a estímulos severos o graves donde la muerte no está tan controlada bioquímicamente, parece que tampoco es un proceso tan descontrolado o tan pasivo. Prueba de esto son estudios que demuestran que la necrosis puede estar controlada genéticamente o que no es un proceso que se escape por completo al control de algunas enzimas. Algunos ejemplos de que en ocasiones la muerte celular parece ser una mezcla de apoptosis y necrosis son trabajos en los que se muestra que las células al morir presentan características morfológicas típicas de la apoptosis sin fragmentación del ADN (Borner et al, 1999; Chautan et al, 1999; Kitanaka et al, 1999). También se han encontrado casos en que el inhibidor de las caspasas z-VAD-fmk no puede rescatar el fenotipo de muerte, cuando se sobreexpresa la proteína pro-apoptótica Bax, aunque la caspasa 3 no se activa y el ADN no se fragmenta (Miller et al, 1997; Xiang et al, 1996).

NECROSIS		APOPTOSIS	
Características morfológicas			
<ul style="list-style-type: none">-Pérdida de la integridad de membrana-Dilatación de la célula y ruptura-No hay formación de vesículas, lisis completa-Desintegración (dilatación) de organelas		<ul style="list-style-type: none">-Deformación de la membrana, sin pérdida de integridad-Condensación y/o reducción celular-Formación de vesículas limitadas por membrana (cuerpos apoptóticos)-No hay desintegración de organelas, permanecen intactas	
Características bioquímicas			
<ul style="list-style-type: none">-Pérdida de la regulación de la homeostasis iónica-No requiere energía (proceso pasivo, también sucede a 4°C)-Digestión del ADN al azar (patrón en mancha del ADN después de electroforesis en gel de agarosa)-Fragmentación poslítica del ADN (último evento de la muerte celular)		<ul style="list-style-type: none">-Proceso muy regulado, implica pasos de activación enzimática-Requiere energía (ATP) (proceso activo, no sucede a 4°C)-Fragmentación del ADN en mono- y oligonucleótidos, no al azar (patrón en escalera después de electroforesis en gel de agarosa)-Fragmentación prelítica del ADN (primer evento de la muerte celular)	
Significado fisiológico			
<ul style="list-style-type: none">-Muerte de grupos de células-Originada por estímulos no fisiológicos-Fagocitosis por macrófagos-Respuesta inflamatoria significativa		<ul style="list-style-type: none">-Muerte de células individuales-Inducida por estímulos fisiológicos-Fagocitosis por estímulos adyacentes o macrófagos-Respuesta no inflamatoria	

Tabla 1.-Resumen de las principales características que diferencian la necrosis y la apoptosis.

Lo que parece ocurrir en algunos casos es que aunque se bloquee la actividad de las caspasas no se bloquean los cambios que tienen lugar en la mitocondria, como la caída del potencial de membrana y la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c o el factor inductor de la apoptosis AIF (*apoptosis induction factor*) (Green et al, 1998). Seguramente estas proteínas, pueden activar otras proteasas como las calpaínas dependientes de calcio o las catepsinas lisosomales que de alguna manera sustituyen a las caspasas pero de forma menos eficiente (Borner et al, 1999) por eso la muerte parece una mezcla de ambas, apoptosis y necrosis.

1. Características bioquímicas de la apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso controlado bioquímicamente. En este control participan numerosas enzimas. Las enzimas clave de la apoptosis son las caspasas. Las caspasas son una familia de cisteína proteasas muy conservadas evolutivamente. En mamíferos se han clonado y caracterizado 14 miembros de la familia de estas proteínas, pero parece que no todas están implicadas en apoptosis. Las caspasas se sintetizan como caspasas inactivas o procaspasas, y se activan por proteólisis en respuesta a algún estímulo apoptótico. Según su localización en las rutas apoptóticas, se diferencian dos tipos de caspasas, las caspasas iniciadoras (caspasa 8, 9, 10) y las caspasas efectoras (caspasa 3, 6, 7). Una vez activas, las caspasas cortan a sus sustratos en secuencias consenso.

La ruta de activación de las caspasas puede iniciarse de dos formas diferentes. O bien por daños en la célula (por ejemplo estrés oxidativo, radiación...) que provocan la salida de factores pro-apoptóticos de la mitocondria, o bien por la unión de ligandos a sus receptores de membrana (por ejemplo la unión de Fas-L/CD-95-L/APO-1-L a su receptor Fas/CD95/APO-1) (Green et al, 1998; Hengartner, 2000; Krammer, 2000). A la ruta que se inicia con la unión de ligandos a receptores de muerte se la denomina ruta extrínseca, y a la ruta que se inicia en respuesta a daños celulares ruta intrínseca (**figura 11**).

1.1 Ruta intrínseca.

A esta ruta también se le denomina ruta mitocondrial o ruta dependiente de la mitocondria ya que este orgánulo juega un papel fundamental en ella. La ruta se inicia en respuesta a diferentes estímulos como pueden ser el estrés oxidativo, la radiación, agentes quimioterapéuticos, inhibición/activación de quinasas o fosfatasas, etc. Estos estímulos afectan a la permeabilidad de la membrana de la mitocondria permitiendo la salida al citoplasma del citocromo c. El citocromo c se une al factor adaptador de proteasas apoptóticas Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) y ambos se unen y activan a la caspasa 9 formando lo que se denomina apoptosoma. La consecuencia de la activación de la caspasa 9 es que ésta activa a las caspasas efectoras, siendo la caspasa 3 la más importante (**figura 11**). La caspasa 3 interviene entre otros procesos en la

degradación del ADN liberando a la DNasa activada por caspasas (CAD) de su inhibidor ICAD y en la inactivación por proteólisis de la enzima implicada en la reparación del ADN PARP, provocando como resultado final la apoptosis.

Junto con el citocromo c, de la mitocondria se liberan otras proteínas que favorecen la progresión de la apoptosis. Una de ellas es el factor inductor de la apoptosis (IAF) que promueve la apoptosis pero aparentemente de manera independiente de las caspasas. Otra proteína pro-apoptótica liberada por la mitocondria es Smac o DIABLO (Hengartner, 2000; Krammer, 2000). La función de Smac o DIABLO consiste en potenciar el desencadenamiento de la apoptosis inhibiendo a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAPs. Esta última es una familia de proteínas muy conservada evolutivamente. Algunos de sus miembros se ha visto que tienen un papel en la regulación del ciclo celular pero su función más importante es antiapoptótica, inhibiendo la actividad de las caspasas (**figura 11**).

Otra familia de proteínas que tienen una gran importancia en la regulación de la apoptosis es la familia de Bcl-2. En humanos se identificaron más de 20 miembros en esta familia entre los que se incluyen proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, etc. y proteínas proapoptóticas como Bax, Bad, Bid, Bok, Bak, etc (Antonsson et al, 2000; Ke et al, 2001). Las proteínas de esta familia regulan la apoptosis controlando la permeabilidad de la membrana, favoreciéndola o inhibiéndola. Normalmente se encuentran formando homodímeros o heterodímeros.

1.2 Ruta extrínseca.

La ruta comienza con la unión de un ligando a un receptor de la superfamilia de los receptores de muerte localizados en la membrana plasmática. Estos ligandos pueden ser Fas-L o diferentes miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La unión del ligando provoca la trimerización de los receptores y la unión de diferentes proteínas adaptadoras al dominio citoplasmático del receptor denominado dominio de muerte o DD (*death domain*). Estas proteínas adaptadoras son específicas para cada tipo de receptor y se unen por su propio dominio de muerte al dominio de muerte citoplasmático de receptor. Las proteínas además de un dominio de muerte por el que se unen al dominio de muerte del receptor poseen un dominio de muerte efector o DED

(*death effector domain*) por el que se unen al DED presente en la procaspasa 8, de manera que esta se une al complejo formado por el receptor y la proteína adaptadora. A continuación la procaspasa 8 es activada proteolíticamente y corta a sus sustratos entre los cuales se encuentra la caspasa 3 que continúa con la ejecución del programa de muerte (Krammer, 2000) (**figura 11**).

Esta ruta puede estar regulada negativamente por proteínas como FLIP que compite con las procaspasas 8 y 10 por la unión al dominio de muerte efector de la proteína adaptadora (Katoaka et al, 1998) (**figura 11**).

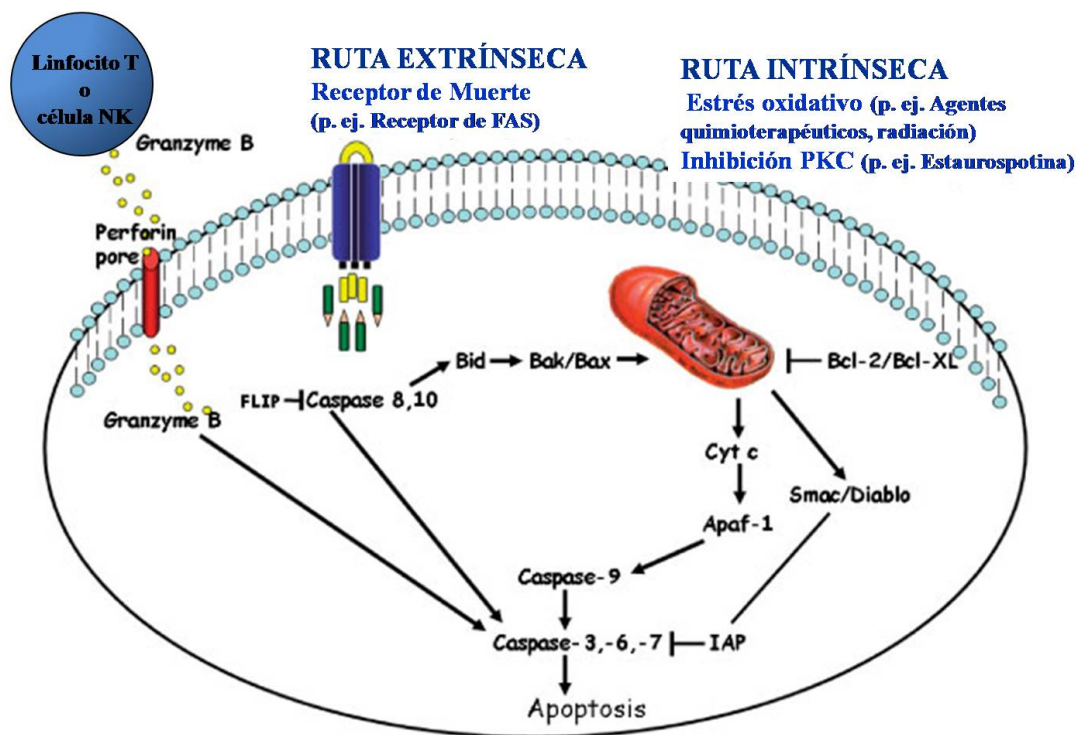


Figura 11.-Representación esquemática de las rutas de señalización que tienen lugar durante la apoptosis. Adaptado de Ozben, T. (2007). *Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy*.

Puede existir una conexión entre ambas rutas apoptóticas. La caspasa 8 puede cortar a la proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 Bid. Tras este corte, Bid se translada a la membrana mitocondrial y se une a Bad, otra proteína de la misma familia. Esta unión permite la salida de citocromo c de la mitocondria. El citocromo c activa a Apaf-1, éste a la caspasa 9 y ésta a la caspasa 3. Aunque esta conexión entre ambas

rutas es posible, es muy poco frecuente, y normalmente ambas rutas funcionan de manera independiente una de la otra (Hengartner, 2000; Ozben, 2006).

OBJETIVOS

Cuando se comenzó este trabajo de investigación solamente se conocía de SOK1 sus condiciones de activación, estrés oxidativo y anoxia química. Se tenían algunos datos preliminares que parecían indicar que su sobreexpresión en fibroblastos NIH3T3 provocaba muerte celular. También se había encontrado en un sistema de doble híbrido utilizando a SOK1 como cebo, una proteína que se denominó SINT-5 (*SOK1 interactor number 5*), que parecía interaccionar con ella. Teniendo en cuenta estos datos, los objetivos de este trabajo fueron:

1. Determinar la participación de SOK1 en la respuesta celular a estrés.
2. Determinar los mecanismos que regulan la actividad de SOK1 y sus efectos biológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PLÁSMIDOS.

1.1 Vectores de expresión de SOK1 en células eucariotas.

En este trabajo se utilizaron para la sobreexpresión de SOK1, mediante transfección en células eucariotas, tres constructos con los que se expresan diferentes regiones de la proteína. Estos constructos son: pCMV5-M2-SOK1 (expresa la proteína entera), pCMV5-M2- Δ C-SOK1 (expresa el dominio catalítico de SOK1, que incluye los 333 aminoácidos del extremo N-terminal) y pCMV5-RD-SOK1 (expresa los 93 aminoácidos correspondientes al dominio regulador de SOK1, localizados en el extremo C-terminal). Los tres constructos fueron descritos por Pombo y colaboradores (Pombo et al, 1997).

1.2 Vectores para traducción in vitro.

Para la traducción in vitro de Mst3 y SOK1 se utilizaron vectores en los que el ADNc de ambas proteínas se encuentra clonado a continuación de un promotor T7. Estos constructos son pDNR-Mst3 (*Harvard Proteomics*) y pMV-HA+2-SOK1. Este último se construyó liberando la región codificante de SOK1 del plásmido pCMV5-M2-SOK1 cortando con la enzima *Pst I* y ligando esta región en el plásmido pMV-HA+2 linealizado con la misma enzima de restricción.

1.3 Vectores de expresión de SINT-5 en células eucariotas.

El plásmido de expresión de SINT-5 se construyó liberando el ADNc de SINT-5 del vector pcDNA3.1/HisA-SINT-5 por digestión con las enzimas *Eco RI* y *Xba I* y ligándolo en el vector pCMV5-HA cortado con las mismas enzimas de restricción.

1.4 Plásmidos de sh-ARN.

Para silenciar la expresión de SOK1, en este trabajo se utilizó la metodología del sh-ARN. Para esto, se diseñaron oligonucleótidos complementarios al ARNm de SOK1, concretamente, complementarios al nucleótido 331 y siguientes. Estos oligonucleótidos se diseñaron con extremos compatibles con los cortes generados por las enzimas de

restricción *Bgl II* y *Hind III*. Tras el anillamiento de los oligonucleótidos, éstos se fosforilaron utilizando la enzima T4 PNK y se ligaron en el plásmido pSuper (cedido por el Dr. René Bernards) digerido con las enzimas *Bgl II* y *Hind III* y defosforilado por tratamiento con la enzima CIP (*calf intestinal phosphatase*).

OLIGONUCLEÓTIDOS		
sh-SOK1	<i>Fw</i>	5'-GAT CCG ATC GTG GCA ATG TAT GTC TCC TCC AGG GGG AAT TCG CTC TGG AGG AGA CGT ATA TTG CTA CGA TCC TTT TTT T-3'
	<i>Rev</i>	5'-AGC TAA AAA AAG GAT CGT AGC AAT ATA CGT CTC CTC CAG AGC GAA TTC CCC CTG GAG GAG ACA TAC ATT GCC ACG ATC G-3'

Tabla 2.- Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para silenciar SOK1.

Como control en los experimentos de sh-ARN, utilizamos un pSuper en el que se encuentra clonada una secuencia para silenciar la expresión del gen de la luciferasa (sh-luci), una proteína que no existe en células de mamífero. Este plásmido también nos fue cedido por el Dr. René Bernards.

1.5 Mutagénesis dirigida.

A partir de alguno de los plásmidos previamente descritos se originaron distintos mutantes utilizando para este fin un kit de mutagénesis dirigida (*Stratagene*). Para llevar a cabo las mutaciones se diseñaron oligonucleótidos donde se incluyeron las variaciones necesarias en la secuencia de nucleótidos para dar lugar al cambio deseado en el/los aminoácidos. El proceso de mutagénesis se llevó a cabo mediante una reacción de PCR que contó con los siguientes componentes: 5 µl del tampón de reacción, 10 ng de plásmido, 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos (disueltos a una concentración de 50 ng/µl), y 1 µl de la mezcla 10 mM de dNTPs, en un volumen total de 50 µl.

Nº de CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95 °C	30 segundos
16	95 °C	30 segundos
	55 °C	60 segundos
	68 °C	1 minuto/Kb de tamaño del plásmido*

Tabla 3.- Condiciones de la PCR empleadas en la mutagénesis dirigida de los diferentes plásmidos.

PLÁSMIDO	TIEMPO
pCMV5-M2-SOK1	7 minutos
pCMV5-M2-ΔC-SOK1	
pMV-HA+2-SOK1	5 minutos 30 segundos
pCMV5-HA-SINT5	5 minutos

***Tabla 4.-** Tiempos empleados en la mutagénesis dirigida de los diferentes plásmidos.

Tras la reacción de PCR, se añade un 1 µl de la enzima *Dpn I* a cada tubo y se incuba a 37 °C durante 1 hora para degradar el ADN parenteral no mutado. A continuación transformamos una alícuota de 50 µl de la cepa bacteria DH5α con 5 µl del producto de PCR. Las bacterias se siembran en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente. Tras 12-16 horas a 37 °C, extraemos el plásmido de varias colonias con un sistema de *miniprep* (*Miniprep expressTM Matrix*, *Q-BIOgene*), y analizamos la presencia de la mutación mediante digestión enzimática, ya que además de la mutación objetivo de nuestro estudio, en todos los oligonucleótidos se introdujo una mutación silente que genera o destruye una diana para alguna enzima de restricción pudiendo así realizar un diagnóstico de los mutantes. Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo se obtuvieron de la casa comercial *New England Biolabs*.

Todas las mutaciones se verificaron por secuenciación además de por corte por enzimas de restricción.

A continuación se muestran varias tablas con las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para mutar cada uno de los plásmidos.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDOS		DIAGNÓSTICO
SOK1-R	Fw	5'-CCA GGT CCT CTA GAG GAA ACG TAT ATC GCC ACG ATC CTG C-3'	Se crea diana <i>Xba I</i>
	Rev	5'-GCA GGA TCG TGG CGA TAT ACG TTT CCT CTA GAG GAC CTG G-3'	

Tabla 5.- Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la construcción del mutante pCMV5-M2-SOK1-R.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDOS		DIAGNÓSTICO
K49R	Fw	5'-CAA AGG AGG TGG CTA TCA GGA TCA TCG ACC TGG-3'	Elimina diana <i>Msc I</i>
	Rev	5'-CCA GGT CGA TGA TCC TGA TAG CCA CCA CCT CCT TTG-3'	
K49R	Fw	5'-CAG ATT AAG AGG AAC GCA TTC GTG GGC ACC CCC-3'	Se crea diana <i>Bsm I</i>
	Rev	5'-GGG GGT GCC CAC GAA TGC GTT CCT CTT AAT CTG -3'	
4A (KK275,276AA) (KR288,289AA)	Fw	5'-CAT CAC ACG CTA CAC CGC GGC GAC GTC CTT CCT CAC G-3'	Se crea diana <i>Aat I</i>
	Rev	5'-CGT GAG GAA GGA CGT CGC CGC GGT GTA GCG TGT GAT-3'	
	Fw	5'-GGA GCT CAT CGA TCG ATA TGC GGC GTG GAA GTC AGA-3'	Se crea diana <i>Cla I</i>
	Rev	5'-CTC TGA CTT CCA CGC CGC ATA TCG ATC GAT GAG CTC C-3'	

Tabla 6.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la construcción de los mutantes pCMV5-M2-SOK1^{K49R}, pCMV5-M2-SOK1^{T174A}, pCMV5-M2-SOK1^{4A}, pCMV5-M2-ΔC-SOK1^{K49R}, pCMV5-M2-ΔC-SOK1^{T174A}, pCMV5-M2-ΔC-SOK1^{4A}.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDOS		DIAGNÓSTICO
SOK1-D303N	Fw	5'-CCA GCT CTG AGA ACT CTG ATA TCG ATG GCG AGG CGG-3	Se crea diana <i>Eco RV</i>
	Rev	5'-CCG CCT CGC CAT CGA TAT CAG AGT TCT CAG AGC TGG-3'	
SOK1-D305N	Fw	5'-GGA GTC CAG CTC TGA GGA TTC GAA CAT TGA TGG CGA GGC-3'	Se crea diana <i>BstBI</i>
	Rev	5'-GCC TCG CCA TCA ATG TTC GAA TCC TCA GAG CTG GAC TCC-3'	
SOK1-D307N	Fw	5'-GCT CTG AGG ACT CTG ACA TTA ATG GCG AGG CGG AGG AC-3'	Se crea diana <i>Ase I</i>
	Rev	5'-CGT CCT CCG CCT CGC CAT TAA TGT CAG AGT CCT CAG AGC-3'	
SOK1-D312N	Fw	5'-GGC GAG GCG GAG AAC GGG GAG CAA GGC CCC ATC TGG-3'	Elimina diana <i>ApaI</i>
	Rev	5'-CCA GAT GGG GCC TTG CTC CCC GTT CTC CGC CTC GCC-3'	
SOK1-D4N (D303,305,307N) (D312N)	Fw	5'-CCA GCT CTG AGA ACT CTA ACA TTA ATG GCG AGG CGG-3'	Se crea diana <i>Ase I</i> (303-5-7)
	Rev	5'-CCG CCT CGC CAT TAA TGT TAG AGT TCT CAG AGC TGG-3'	
	Fw	5'-GGC GAG GCG GAG AAC GGG GAG CAA GGC CCC ATC TGG-3'	Elimina diana <i>Apa I</i> (312)
	Rev	5'-CCA GAT GGG GCC TTG CTC CCC GTT CTC CGC CTC GCC-3'	
SOK1-D347N	Fw	5'-CAC AGA AGC CTG CGA ACG TCG ACA AGA GGC AGC CG-3'	Se crea diana <i>Sal I</i>
	Rev	5'-CGG CTG CCT CTT GTC GAC GTT CGC AGG CTT CTG TG-3'	

Tabla 7.- Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la construcción de los mutantes pMV+2-HA-SOK1^{D303N}, pMV+2-HA-SOK1^{D305N}, pMV+2-HA-SOK1^{D307N}, pMV+2-HA-SOK1^{D312N}, pMV+2-HA-SOK1^{D4N} y pMV+2-HA-SOK1^{D347N}.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDOS		DIAGNÓSTICO
SINT5-RVR	Fw	5'-CGA ATA CTG GAG GTT GGC TGT CGC GTA CGA AAC ACAGTC TTT C-3'	Se crea diana
	Rev	5'-GGA AAG ACT CTC TTT CGT ACG CGA CAG CCA ACC TCC AGT ATT C-3'	<i>Xba I</i>

Tabla 8.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción del mutante pCMV5-HA-SINT-5^{RVR}.

Tras el análisis de las colonias bacterianas, una de las positivas se inoculó en 500 ml de medio de cultivo Luria-Broth (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl) y los plásmidos se purificaron en todos los casos utilizando un sistema purificación de ADN (*Wizard® Plus Maxiprep, Promega*).

2. TRADUCCIÓN *IN VITRO* Y ANÁLISIS DEL CORTE DE SOK1 POR LA CASPASA 3.

2.1 Traducción *in vitro*.

Las traducciones *in vitro* de Mst3 y SOK1 se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema para transcripción/traducción *in vitro* de proteínas (*Promega*). La reacción se prepara mezclando en un tubo eppendorf de 0,5 ml 40 µl de TNT[®] T7 Quick Master Mix (*Promega*), 1 µg del plásmido en el que se encuentra clonado el ADNc de la proteína a traducir a continuación de un promotor T7, 2 µl de [³⁵S]metionina (10 mCi/ml) (*G.E. Healthcare*) y el volumen se completa hasta 50 µl con H₂O libre de RNAsas. Para que transcurra la reacción, el tubo debe incubarse en un baño a 30 °C durante 60-90 minutos.

2.2 Corte con caspasa 3.

Para analizar si las proteínas son cortadas por la caspasa 3, se toman 2 µl del producto de traducción y se incuban con 100 ng de caspasa 3 recombinante humana purificada (*BD Pharmingen*) en un tubo eppendorf de 0,2 ml. La reacción de corte se hizo en un volumen total de 20 µl y en tampón de ensayo para caspasas hipotónico (PIPES pH 7.2, 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; CHAPS 0,1%; Sucrosa 10%). La reacción se deja transcurrir durante 90 minutos en un baño a 37 °C. Para verificar la

especificidad del corte, se llevó cabo una reacción paralela en presencia 1 μ M del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk (*Sigma*).

La reacción se para añadiendo tampón de carga de Laemli (glicerol 50%; Tris-HCl pH 6.8 250 mM; SDS 10%; DTT 500 mM; azul de bromofenol 0,4%) y a continuación se somete a electroforesis en un gel de acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). Tras la electroforesis, el gel se tiñe con azul de coomasie (ácido acético 10%; metanol 50 %; azul de coomasie 0,05%; H₂O 40 %) durante 20-30 minutos. Tras la tinción el gel se fija y se destiñe durante un mínimo de una hora en solución de destinción (10% ácido acético, 50% metanol, 40% H₂O). A continuación el gel se mantiene en agitación durante 30 minutos en una solución 1 M de salicilato sódico (*Sigma*). Por último el gel se seca utilizando un sistema de vacío y se expone con una película de autorradiografía a -80°C.

3. CULTIVOS CELULARES.

Gran parte de los experimentos de este trabajo están realizados en diferentes tipos de líneas celulares. A continuación se describen los principales procesos relacionados con el manejo de estas líneas.

3.1 Líneas celulares utilizadas.

La línea celular de riñón embrionario humano, **HEK 293**, que contiene en su ADN fragmentos de adenovirus tipo 5; la línea celular de riñón de mono verde africano transformada con el virus SV40, **Cos7**; y la línea celular de osteosarcoma humano, **SaOS2**; fueron cultivadas en medio Dulbeccos's modified Eagle's Medium con 1000 mg de glucosa/L (DMEM, *Sigma*). La línea celular de carcinoma epitelial de cérvix humano transformada con el papiloma virus humano 18 (HPV18), **HeLa**; fue cultivada en medio Minimum Essential Medium Eagle (MEM, *Sigma*). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 10% v/v de suero bovino fetal (FBS) (*Invitrogen*), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 100 U/ml de glutamina (GPS, *Sigma*)

Las cuatro líneas se mantuvieron en un incubador a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera humificada al 95% de saturación.

3.2 Contaje celular.

A la hora de realizar los experimentos, es necesario partir de un número determinado de células, que además ha de ser siempre el mismo cada vez que un experimento se repite para que éste sea reproducible. Para partir siempre del mismo número de células en cada experimento, es necesario contarlas. Las células se lavan con PBS, se tripsinizan y se recogen en medio de cultivo. Se hace una dilución 1:5 de las células recogidas (100 µl de la suspensión celular/400 µl de PBS). De esta dilución se introducen 10 µl en una cámara de Neubauer y se cuentan en un microscopio al menos cinco campos (cinco recuadros de la cámara de Neubauer). El número de células se determina:

Nº de células por ml	(suma células contadas/nº cuadros contados) x 5 x 10 ⁴
Nº de células totales	nº de células por ml x nº de ml de la suspensión celular

3.3 Tratamientos celulares.

Para llevar a cabo alguno de los experimentos de este trabajo, las distintas líneas celulares fueron sometidas a diferentes tratamientos y estímulos.

-Estrés oxidativo: se llevó a cabo añadiendo al medio de cultivo peróxido de hidrógeno (H₂O₂, *Sigma*) 500 µM para favorecer la aparición de radicales libres o especies reactivas del oxígeno en las células.

-Anoxia química: para reproducir en los cultivos celulares un modelo de anoxia o isquemia añadimos al medio cianuro sódico (CN, *Sigma*) y 2-Deoxiglucosa (2-DG, *Sigma*) ambos a una concentración 5 mM, que alteran la cadena de transporte de electrones mitocondrial y el ciclo de Krebs favoreciendo también la aparición de radicales libres.

-Estrés osmótico: se indujo manteniendo las células en medio de cultivo suplementado con cloruro sódico (NaCl) 400 mM durante dos horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavan dos veces con PBS (este momento se considera el tiempo de

inicio del tratamiento) y de mantienen en medio isosmótico durante el tiempo indicado en cada experimento.

-Antioxidantes: para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno en el medio de cultivo, se utilizaron dos antioxidantes diferentes. N-Acetyl-L-Cystein (NAC, *Sigma*), a una concentración de 5 mM, y un pretratamiento de 2 horas antes del estímulo que favorezca la aparición de radicales libres y Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, *Sigma*), a una concentración de 100 μ M y un pretratamiento de 30 minutos.

-Inhibición de la actividad de las caspasas: para reproducir en los cultivos celulares un estado en el que las caspasas no actúen o no sean funcionales, se trataron los cultivos con dos inhibidores, un inhibidor de amplio espectro, z-VAD-fmk (*Sigma*), y un inhibidor específico de la caspasa 3, Ac-DEVD-CHO (*Alexis*). Ambos se utilizaron a una concentración de 50 μ M y se mantuvieron presentes en el medio de cultivo durante la duración de todo el experimento.

3.4 Determinación de la viabilidad celular.

En un determinado cultivo de células, podemos estar interesados en saber qué porcentaje de éstas es no viable tras un determinado estímulo o tratamiento. La determinación de este porcentaje en los experimentos de este trabajo se hizo mediante el método de exclusión de azul de tripano.

Para llevar a cabo este método, las células se tripsinizan y se recogen en medio en un tubo de 15 ml. Teniendo en cuenta que queremos determinar qué porcentaje de la población celular es viable y qué porcentaje no lo es, recogemos también el medio de cultivo en el que se encontraban las células debido a que puede haber células muertas despegadas. Las células se centrifugan 5 minutos a 900-1.000 rpm, se aspira el medio y se resuspenden en medio de cultivo nuevo. A continuación se hace una dilución 1:5 de la suspensión celular en azul de tripano 0,4% (p/v) (*Sigma*). De esta dilución se introducen 10 μ l en una cámara de Neubauer y se cuentan las células como se describe en el apartado 1.2. Además de contar el número de células totales debemos determinar también el número de células no viables, que aparecen teñidas de azul y no refringentes. De esta forma, además del número de células totales presentes en el cultivo, podemos

determinar número y porcentaje de células viables y no viables siguiendo los cálculos que se explican en el apartado 1.2.

4. TRANSFECCIONES E INFECCIONES.

4.1 Transfección con DEAE-Dextrano-Cloroquina.

Para la línea celular Cos7 se utilizó el protocolo de transfección del DEAE-Dextrano-Cloroquina (Loperta et al, 1984; *Current Protocols in Molecular Biology*). Para esto se siembran las células 48 horas antes de llevar a cabo la transfección para que alcancen una confluencia aproximada del 90% (285.000 células para una placa de 60 mm de diámetro). Para la transfección se mezclan 2 ml de DMEM suplementado con el 10 % (v/v) de Nu serum y 80 μ l de PBS/DEAE-Dextrano-Cloroquina (10 mg/ml de DEAE-Dextrano, 2,5 mM cloroquina en PBS). A continuación se añaden un total 8 μ g del plásmido o plásmidos a transfectar, se homogeniza, y se sustituye el medio de cultivo de la placa que vamos a transfectar por la mezcla anterior. Las células se mantienen con la mezcla de transfección en condiciones estándar de cultivo durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se someten a un choque durante 2 minutos con 2 ml de DMSO al 10 % en PBS. Transcurridos los dos minutos, las células se lavan dos veces con PBS y se añade medio de cultivo nuevo.

En el caso de transfecciones en placas de 90 mm de diámetro, la cantidad de células sembradas como la cantidad de los diferentes componentes de la transfección, se varía de manera proporcional a la superficie de la placa de cultivo.

4.2. Transfección mediante el método de precipitación con fosfato cálcico.

Para la transfección de las líneas celulares HEK 293 y SaOS2 se utilizó el método de la precipitación con fosfato cálcico (Wigler et al, 1979; *Current Protocols in Molecular Biology*), aunque con algunas diferencias entre ambas líneas.

4.2.1 Transfección de la línea celular HEK 293.

Las células se siembran 24 horas antes de llevar a cabo la transfección a una densidad de 500.000-600.000 células por placa de 60 mm de diámetro para que en 24 horas alcancen una confluencia del 80-90%. Aproximadamente tres horas antes de la transfección se cambia el medio a las células y se sustituye por medio con cloroquina 25 μ M.

Para dos placas de 60 mm de diámetro, se preparan 500 μ l de mezcla de transfección. Se procede mezclando en un tubo de 25 ml 10 μ g del plásmido o plásmidos a transfectar, 125 μ l de CaCl_2 0,5 M y se completa la mezcla con H_2O miliQ hasta un total de 250 μ l. En otro tubo se pipetea 250 μ l de HBBS (Hepes pH 7.9, 50 mM; NaCl 280 mM; KCl 10 mM; Glucosa 12 mM; Na_2HPO_4 1,5 mM; ajustado a pH 7.05). A continuación se pipetea gota a gota la mezcla de plásmido, CaCl_2 y H_2O sobre el HBBS mientras éste se burbujea con una pipeta *pasteur* para facilitar la formación de los cristales o precipitados de fosfato cálcico. De esta mezcla, se añaden 250 μ l por cada placa de 60 mm de diámetro y se mantienen entre 12-16 horas en el incubador. Tras este tiempo, se retira el medio con la mezcla de transfección y las células se lavan dos veces con PBS. A continuación se añade medio nuevo. Este punto, se considera el tiempo 0, o el momento de inicio de la transfección.

4.2.2 Transfección de la línea celular SaOS2.

El procedimiento es similar al descrito para las células HEK 293. Estas células para transfectarse necesitan un alto porcentaje de confluencia, mayor al 90%, y para esto se siembran 500.000 por placa de 60 mm 24 horas antes de la transfección. En esta línea celular, el medio debe cambiarse una hora antes de transfectar. La mezcla de transfección se prepara igual que para las células HEK 293, pero a diferencia de éstas, una vez preparada esta mezcla, debe incubarse 15 minutos a temperatura ambiente antes de añadirla a la placa de cultivo. El resto del procedimiento es igual al descrito previamente para la línea celular HEK 293 en el apartado 4.2.1.

4.3. Infección con adenovirus.

4.3.1 Generación de los adenovirus.

El sistema de adenovirus que expresan GFP y SOK1 o GFP y β -galactosidasa clonados en un sistema de expresión bicistrónico fue creado en colaboración con el Dr. Thomas Force (*Cardiomyocyte Biology Laboratory, New England Medical Center, Tufts University, Boston/Actualmente en Center for Translational Medicine, Jefferson Medical College, Philadelphia*). Para generar los adenovirus de expresión de SOK1 la región codificante de la proteína se extrajo del vector pMT3-SOK1 cortando con la enzima de restricción Pst I. Este fragmento fue tratado con la enzima T4 DNA polimerasa para generar extremos romos y fue introducido en el vector pAdTrack-CMV digerido con la enzima Eco RV.

4.3.2 Amplificación de los adenovirus.

Para la amplificación de los adenovirus se utilizó la línea celular HEK 293. Para una primera amplificación a pequeña escala se sembraron 800.000 células por placa de 60 mm de diámetro. Tras 36 horas, cuando las células presentan una confluencia mayor 90%, se añaden en un volumen total de 200 μ l de medio sin suero 4 partículas virales por célula. Si no se conoce exactamente la concentración de partículas virales en el stock, se supone que están a 10^8 virus/ml. Las células se mantienen en el incubador con los 200 μ l que contienen las partículas virales durante una hora agitando la placa cada 20 minutos para distribuir uniformemente la suspensión viral por toda la superficie de la placa. Después de 1 hora, se añaden 4 ml de medio de cultivo suplementado con el 2% de FBS. Cuando las células están completamente despegadas de la placa, 3-4 días después de la infección, las células y el medio de cultivo se pasan a un tubo estéril y los virus se liberan completamente de las células lisando estas mediante tres ciclos de congelación/descongelación por inmersión en nitrógeno líquido e inmersión en un baño con agua a 37 °C. Los restos celulares se eliminan por centrifugación a 4 °C y 6.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante, que contiene las partículas virales, a una concentración que se estima entre 10^8 - 10^9 virus por ml, se alicuotea en tubos eppendorf, se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C.

Para una amplificación a gran escala, se siembran 3.600.000 células HEK 293 por *flask* de cultivo de 150 cm². La infección se lleva a cabo con el mismo número de partículas virales por célula que en el caso de la expansión a pequeña escala pero en un volumen de 5 ml, que tras 1 hora en el incubador, se completa hasta 45 ml con medio con el 2% de FBS. Cuando las células se despegan totalmente de la superficie del flask, se procede como se describe en el caso de la amplificación a pequeña escala para liberar las partículas virales de las células.

4.3.3 Infección de células HeLa.

Para llevar a cabo la infección de células HeLa, estas se sembraron a una densidad de 250.000 células por placa de 60 mm de diámetro. Transcurridas 24 horas después de la siembra, se retira el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con PBS. A continuación se añaden las partículas virales, que en los experimentos mostrados en este trabajo constituyen una multiplicidad de infección de 50 virus por célula, en un volumen de 450 µl de medio sin suero. Las placas se mantienen con este volumen de medio durante una hora en el incubador. Durante esta hora, se agitan las placas cada 20 minutos para distribuir uniformemente el medio de cultivo por toda la superficie de la monocapa de células. A continuación el volumen de cada placa se completa hasta 4 ml con medio suplementado con el 2% de FBS.

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

Después del tiempo requerido en cada experimento (se indica en las distintas figuras) tras las diferentes transfecciones, infecciones o tratamientos celulares, se procedió a la obtención de extractos proteicos para los análisis realizados sobre las distintas proteínas objetivo de nuestro estudio. Dependiendo del tipo de experimento y del tipo de proteína a estudiar, la obtención de extractos proteicos se llevó a cabo con diferentes protocolos y con diferentes tampones de extracción proteica.

5.1 Obtención de extractos proteicos con el tampón SAPK (*Stress activated protein kinase*).

Para el análisis mediante western blot de SOK1, M2-SOK1 y para los ensayos de actividad quinasa, la extracción proteica se llevó a cabo con el tampón SAPK. Para la extracción proteica con este tampón, se retira el medio de cultivo de las células y se lavan con PBS. A continuación se tripsinizan y se recogen en tubos de 15 ml en medio de cultivo y se centrifugan durante 5 minutos a 900-1.000 rpm. Tras la centrifugación, se aspira el medio y el sedimento de células se lava con 5 ml de PBS frío y se vuelven a centrifugar. Se retira el PBS y las células se resuspenden en tampón de lisis SAPK (HEPES pH 7.4, 20 mM; EGTA 2 mM; Na₃VO₄ 1 mM; 1% triton X-100; 10% glicerol; 50 mM β-glicerofosfato; DTT* 1 mM; leupeptina* 2 μM, PMSF* 400 μM y aprotinina* 2,3 μg/ml). El volumen de tampón utilizado, aunque puede variar dependiendo de la línea celular y de la confluencia de las células fue de 300 μl para una placa de 90 mm y de 150 μl para una placa de 60 mm. Una vez resuspendidas las células en este tampón, se pasan a tubos eppendorf. Se mantienen durante 15 minutos en hielo vorteadando cada 5 minutos. Transcurridos los 15 minutos se centrifugan a 4 °C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Tras la centrifugación se pipetea el sobrenadante y se deposita en un tubo eppendorf nuevo. A continuación los extractos se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C.

5.2 Obtención de extractos proteicos con tampón RIPA.

Para el estudio mediante western blot de la proteína implicada en la reparación de ácidos nucleicos PARP, la extracción proteica se llevó a cabo con tampón RIPA.

Se lavan las células con PBS, se tripsinizan y se centrifugan durante 5 minutos a 900-1.000 rpm. Se retira el medio, se lavan con PBS frío y se vuelven a centrifugar. Tras la centrifugación se retira el PBS y el precipitado celular procedente de una placa de 60 mm se resuspende en 150 μl de tampón RIPA preparado en PBS (NP-40 1%; deoxicolato sódico 0,5%; SDS 0,1%; Na₃VO₄ 1 mM; PMSF* 1mg/ml de tampón; aprotinina* 70 μg/ml de tampón). Una vez resuspendidas las células, se pasan a tubos eppendorf y se mantienen durante media hora en hielo. A continuación se centrifugan a

4 °C durante 20 minutos a 13.000 rpm. Se pasa el sobrenadante a tubos limpios, se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C.

5.3 Obtención de extractos proteicos para el estudio del citocromo c citoplasmático.

Se tripsinizan las células y se cuentan en cámara de Neubauer para partir en todas las condiciones a estudiar del mismo número de células que debe ser entre 5.000.000-7.000.000. Una vez contadas se centrifugan y se lavan con PBS. Después de la centrifugación el precipitado de células se resuspende en 100 µl de tampón para citocromo c (sucrosa 250 mM; HEPES-KOH pH 7.5, 20 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT* 1 mM; PMSF* 0,1 mM). Las células resuspendidas en este tampón se depositan en un homogenizador tipo dounce. Para romper las células se dan 30 golpes con el émbolo de homogenizador. A continuación se pasa la suspensión celular de nuevo a tubos eppendorf y se centrifugan a 4 °C durante 15 minutos a 15.000 rpm para eliminar la fracción mitocondrial de las células. El sobrenadante se pasa a un tubo eppendorf nuevo, se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °.

(* Inhibidores de proteasas: se añaden justo en el momento de utilizar el tampón de lisis, y una vez añadidos el tampón debe mantenerse siempre en hielo).

6. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS.

6.1 Inmunoprecipitación.

Los extractos proteicos se cuantificaron mediante el método de Bradford, (Bradford, 1976) utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (*Bio-Rad*) midiendo la absorbancia mediante espectrofotometría. Tras la cuantificación, para proceder con la inmunoprecipitación, se tomaron entre 500 µg y 1 mg de proteína, se llevaron a un volumen de 900 µl con tampón de SAPK y se añadió el anticuerpo desarrollado contra la proteína a inmunoprecipitar. Los extractos proteicos con el anticuerpo se mantienen durante 45 minutos en agitación rotacional a 4 °C. A continuación se añaden 40 µl de una suspensión al 50% de matriz proteína G-Agarosa (*Roche diagnostics*). Después de un total de 3 horas en agitación a 4 °C, la matriz se sedimenta por centrifugación y el

precipitado se lava 3 veces con tampón de SAPK. A continuación se añade tampón de carga de Laemli y las muestras se hierven durante 5 minutos a 95 °C.

6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida y western blot.

Una vez añadido el tampón de carga de Laemli, los extractos proteicos se resuelven mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando tampón de electroforesis (Tris 50 mM; glicina 400 mM; SDS 0,2%). Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (*Whatman®*, *Schleider and Schuel*) utilizando tampón de transferencia húmeda (Tris 20 mM; glicina 150 mM, metanol 20%). Tras la inmunoprecipitación los extractos proteicos se sometieron a electroforesis y transfencia a membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System (*Amersham Biosciences*).

Tras la transferencia, la membrana se lava durante 5 minutos en PBS y a continuación se mantiene en solución de bloqueo realizada en PBS (0,2% de I-Block, *Tropix*; 0,1% de Tween-20, *Sigma*). El bloqueo puede hacerse durante 12-16 horas a 4°C o alternativamente 1 hora a temperatura ambiente. La hibridación con el anticuerpo primario (la dilución de los anticuerpos se indica en la tabla 8) se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios también se hibridaron en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la hibridación con los anticuerpos, tanto primario como secundario, las membranas deben someterse a 5 lavados de 5-10 minutos cada uno con una solución que contiene el 0,1% de Tween-20 en PBS. La detección de las proteínas se llevó a cabo con un kit comercial (*Tropix*) basado en la reacción quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina, conjugada con el anticuerpo secundario.

Para rehibridar las membranas con un anticuerpo diferente, se retiran los anticuerpos de una primera hibridación agitando las membranas durante una hora a temperatura ambiente en una solución compuesta por glicina pH 2.2 a una concentración 0,2 M; SDS 0,1% y 1% de Tween-20 seguida de 5 lavados de 5-10 minutos en PBS con 0,1% de Tween-20.

1 ^{er} ANTICUERPO	DILUCIÓN	% SDS PAGE	2 ^o ANTICUERPO/ DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
YSK1 (N-19) sc-6865	WB 1:14000	10%	Cabra (1:14000)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
SOK1 R-4865*	IP 7µl/ml	-	-	-
FLAG [®] -M2	WB 1:8000	10%	Ratón (1:5000)	-
	IP 5 µl/ml	-	-	
HA**	WB 1:10	12%	Ratón (1:5000)	-
	IP:1:10	-	-	
Citocromo c 7H8.2C12	WB 1:2500	15%	Ratón (1:5000)	<i>BD Pharmingen</i>
PARP (H-250) sc-7150	WB 1:5000	8%	Conejo (1:5000)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
GAPDH 6C5	WB 1:2500	10%	Ratón (1:5000)	<i>Calbiochem</i>
α-Tubulina B-5-1-2	WB 1:2500	10%	Ratón (1:5000)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

Tabla 8.- Relación de anticuerpos utilizados para western blot e inmunoprecipitación. Se especifica además la dilución de uso para cada uno de ellos y la casa comercial en la que se compraron.

*SOK1 R-4865: suero de conejo obtenido tras la inmunización de éste con un péptido correspondiente al extremo C terminal de SOK1.

**HA: sobrenadante del cultivo del hibridoma 12Ca5

6.3 Ensayos de actividad quinasa.

Para determinar la actividad quinasa de SOK1, inmunoprecipitamos entre 500 µg y 1 mg de extracto proteico con el anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo C-terminal de SOK1, o bien con el anticuerpo monoclonal anti-M2 en los casos en que las células fueran transfectadas con SOK1 unida a este epitopo. Tras la inmunoprecipitación, el sedimento de proteína G-agarosa se lava tres veces con tampón de SAPK, tres veces con tampón de litio (LiCl 500 mM; Tris-HCl pH 7.6, 100 mM; triton X-100 0,1%; DTT 1 mM) y tres veces con tampón de ensayo (MOPS pH 7.2, 20 mM; EGTA 2 mM; MgCl₂ 10 mM; triton X-100 0,1%; DTT 1 mM). Tras el último lavado con tampón de ensayo el precipitado de proteína G-agarosa se escurre completamente con ayuda de una aguja hipodérmica y una jeringuilla. A continuación el sedimento se resuspende 1:1 (v/v) en tampón de ensayo y se divide la muestra en dos

para poder realizar duplicados del ensayo. El ensayo se lleva a cabo añadiendo a cada muestra 10 µg de MBP (*Sigma*), MgCl₂ 10 mM, ATP (*Sigma*) 0,5 mM; y [γ -³²P]ATP 100 µM (3.000-9.000 c.p.m./pmol) (G. E. *Heathcare*). Se deja transcurrir la reacción durante 5 minutos a 30 °C y se para con tampón de carga de Laemli. Las distintas muestras se someten a electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tras la electroforesis el gel se tiñe con azul de coomasie durante 30 minutos y se destiñe con solución de destinción (10% ácido acético, 50% metanol, 40% H₂O) durante 24-36 horas. A continuación el gel se seca al vacío y se expone con una película de autorradiografía a -80 °C.

Para cuantificar la fosforilación, se cortan las bandas de la MBP del gel, y se miden sumergidas en líquido de centelleo en un contador de partículas β (*1414 liquid scintillation counter. Wallac-Winspectral*).

7. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN.

La extracción de ARN de las líneas celulares HEK 293, SaOS2 y HCA2, se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol[®] (*Invitrogen*). Una vez extraído el ARN, se secaron 40 µg de cada una de las muestras en un liofilizador *speed-vac*. El precipitado una vez seco, se resuspendió en una solución de H₂O DEPC que contiene 1x de tampón para electroforesis de ácidos nucleicos, 10x de MOPS, 3,7% de formaldehído, formamida desionizada y tampón de carga para electroforesis de ácidos nucleicos. Las muestras se calentaron durante 20 minutos a 65 °C realizando agitaciones intermitentes. A continuación las muestras se sometieron a electroforesis a 70 V durante 2 horas en un gel de agarosa al 1,5% y paraformaldehído. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por MOPS 0,02 M pH 7.0, acetato sódico 5 mM, y EDTA pH 8.0 a una concentración 0,5 mM. Tras la electroforesis se realiza la transferencia a membranas de *nylon* durante 16-18 horas y a continuación la membrana se expone durante 5 minutos a luz ultravioleta para fijar la unión del ARN.

La sonda se obtuvo cortando el ADNc de SINT5 clonado en el vector pCMV5 con las enzimas *Eco RI* y *Pst I*. Para el marcaje radiactivo de la sonda, se utilizó un kit de marcaje al azar *random priming* NEBlot[®] kit (*New England Biolabs*). El marcaje se llevó a cabo en una reacción donde se mezclan, en un volumen de 16 µl de 60 a 100 ng de sonda, que se desnaturaliza durante 10 minutos a 95 °C; 3 µl de tampón de reacción

(incluido en el kit); 1,5 µl de cada uno de los diferentes dNTP's (excepto dCTP), a partir de un stock 10 mM; 50 µCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol) (*G.E. Healthcare*); y 1,5 µl (5 U/µl) del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa de *E. coli*. La reacción de marcaje se deja transcurrir durante 1 hora y treinta minutos a 37 °C.

Una vez finalizada la reacción, la sonda marcada se separa de la no marcada con columnas Sephadex G-50 (Micro SpinTM S-200 HR; *Amersham pharmacia*). Para esto, se equilibra la columna con tampón de elución (Tris pH 7.5, 10 mM; EDTA pH 8.0, 1 mM) y se separan 3 fracciones de 400 µl cada una correspondientes respectivamente al DNA no marcado, DNA marcado y [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP que no se ha incorporado a la sonda. La eficiencia del marcaje se determina en un contador de centelleo.

Antes de hibridar con la sonda, la membrana se incuba un mínimo de 6 horas en tubos cilíndricos de cristal y en agitación rotacional a 42 °C con solución de prehibridación. La solución de prehibridación está compuesta por 17% de tampón P (BSA 1%; PVP 1%; Ficoll 1%; Tris pH 7.5, 250 mM; pirofosfato de sodio 0,5%; SDS 0,5%), 50% de formamida y 33% de sulfato de dextrano. A esta solución, en el momento de empezar la prehibridación se le añade NaCl 0,7 mM y 10 µg/ml de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado durante 5 minutos a 95 °C.

Tras la prehibridación se procede con la hibridación. Para esto, se pipetea la sonda marcada, previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 95 °C, en la solución de prehibridación presente en los tubos. La hibridación se realiza también a 42 °C durante 24 horas.

Tras la hibridación, las membranas se lavan dos veces durante 5 minutos con SSC 2x a temperatura ambiente. Se lavan 2 veces con SSC 2x con 0,5% de SDS durante 30 minutos a 65 °C, y por último se lavan otras dos veces durante 5 minutos con SSC 0.1x a temperatura ambiente. Por último, las membranas se escurren y se exponen con una película autorradiográfica a -80 °C.

Para estimar el peso de las bandas de reacción obtenidas al revelar la película autorradiográfica, las comparamos con la distancia existente entre los pocillos del gel y las bandas correspondientes al ARN de 18 unidades de sedimentación (18s) y al ARN de 28 unidades de sedimentación (28s), visualizados al teñir el gel con bromuro de etidio e iluminar éste con luz ultravioleta en un transiluminador antes de proceder con la

transferencia. Teniendo en cuenta que el ARN 18s consta de 1900 pb y el ARN 28s de 4900 pb, al medir la distancia entre los pocillos en los que se introdujo el ARN y éstas bandas, y al compararla con la distancia a la cual se encuentran las bandas originadas por nuestra sonda, podemos estimar el peso de éstas últimas

8. DETECCIÓN DE CITOTOXICIDAD. LIBERACIÓN DE LDH.

La detección de liberación de LDH por parte de las células se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de fabricante del Kit (*Roche diagnostics*). Cuatro días después de la trasfección de las células HEK 293 con el sh-RNA dirigido contra la luciferasa (sh-luci) y con el sh-RNA dirigido contra SOK1 (sh-SOK1), las células se sembraron en medio de ensayo (DMEM suplementado con el 1% de FBS) en una placa de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo. Transcurridas 12 horas después de la siembra, las células fueron sometidas a los distintos tratamientos objetivo de nuestro estudio: 1% de triton X-100, cianuro sódico y 2-deoxi-D-glucosa ambos 5 mM, H₂O₂ 500 µM y estaurosporina 1 µM. Después del tratamiento, se tomaron 100 µl de medio de cada pocillo y se pasaron a una nueva placa para lectura en ELISA de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 100 µl de mezcla de reacción y la placa se incubó durante 30 minutos a 20 °C protegida de la luz. La reacción se paró añadiendo a cada pocillo 50 µl de HCl 1N, y la liberación de LDH al medio de cultivo se determinó midiendo la placa en un lector ELISA a 455 nm.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el test no paramétrico de Mann-Withney.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE SOK1 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Tal como se menciona en la introducción, varias de las proteínas clasificadas en el mismo grupo que SOK1, las quinasas Ste20 de mamíferos, están implicadas o relacionadas con procesos de muerte celular (revisado por Dan et al, 2000). Si nos centramos en el grupo de las quinasas Mst, que engloba las subfamilias GCK-II y GCK-III de las Ste20, actualmente la relación con la muerte celular está descrita para prácticamente todos sus miembros (revisado por Pombo et al, 2007). Sin embargo, la relación de las demás Msts con procesos de muerte celular no estaba descrita cuando SOK1 fue clonada y se empezó este trabajo para intentar caracterizar su función en la célula.

Cuando se empezó este trabajo de investigación, además de que la caracterización de las demás proteínas Mst no estaba tan avanzada, de SOK1 solamente se conocían los estímulos que provocan su activación. Actualmente, gracias al trabajo publicado en el año 2004 (Preisinger et al, 2004) se sabe que SOK1 juega un papel en el mantenimiento de la estructura del aparato de Golgi en células no sometidas a estrés. Las condiciones de activación de SOK1 (estrés oxidativo), hicieron pensar que la quinasa podría tener un papel en la respuesta celular a este tipo de estrés, a pesar de que no modula la actividad de ninguna de las rutas de la MAPK descritas hasta el momento (Osada et al, 1997; Pombo et al, 1996; Pombo et al, 1997). También se contaba con algunos datos preliminares que parecían relacionar la sobreexpresión de SOK1 por microinyección con la muerte de fibroblastos de ratón embrionario (NIH3T3).

1.1 La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte en diferentes líneas celulares.

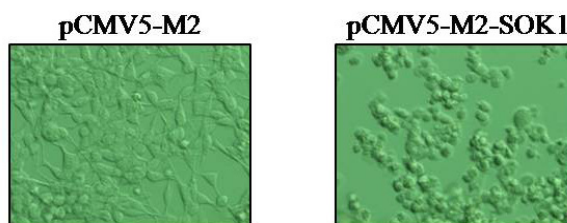
Entre otros métodos, la sobreexpresión de una proteína se utiliza para poder avanzar en el estudio de su función celular. En la literatura se encuentran numerosos casos de proteínas cuya función ha podido caracterizarse mediante su sobreexpresión en diferentes líneas celulares.

Basándonos en estos antecedentes nos propusimos estudiar los efectos de la sobreexpresión de SOK1 sobre la viabilidad de diferentes líneas. Sobreexpresamos en primer lugar SOK1 clonada en el plásmido pCMV5 en la línea celular de de riñón

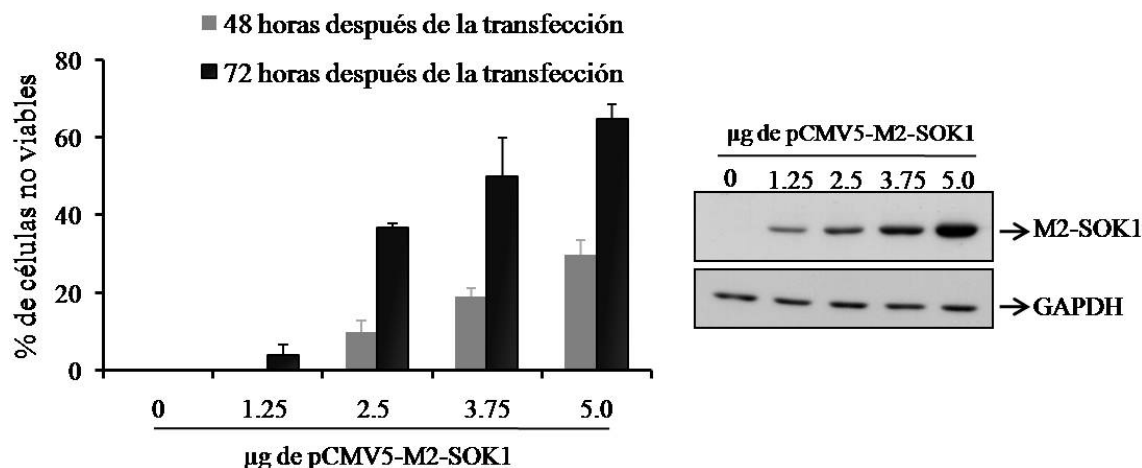
embrionario humano HEK 293 transfectándolas mediante el protocolo de precipitación de fosfato cálcico. Tras la sobreexpresión de SOK1, las células modifican su morfología, se redondean y se despegan completamente de la placa de cultivo, datos indicativos de que podrían estar muriendo (**figura 12a**). Para verificar este resultado estudiamos la viabilidad celular mediante exclusión de azul de tripano. Utilizando esta técnica comprobamos que la sobreexpresión de SOK1 provoca la muerte de estas células y que esta muerte es directamente proporcional al tiempo transcurrido después de la transfección. Mediante *western blot* comprobamos que el porcentaje de muerte observado es también directamente proporcional a la cantidad de proteína sobreexpresada (**figura 12b**).

Para ver si era un efecto general y no específico de esta línea celular, sobreexpresamos la quinasa en otras tres líneas celulares de diferente origen. Las líneas elegidas fueron la línea de osteosarcoma humano SaOS2, la línea de riñón de mono verde africano COS-7 y la línea de carcinoma de cérvix humano HeLa. Los protocolos elegidos para la sobreexpresión fueron el de la precipitación con fosfato cálcico para la línea SaOs2, transfección con DEAE-Dextrano-Cloroquina para la línea COS-7, e infección con adenovirus recombinantes que sobreexpresan SOK1 y GFP clonados en un sistema de expresión bicistrónico para la línea celular HeLa. Al igual que en el caso de las células HEK 293 comprobamos mediante exclusión de azul de tripano, 72 horas después de la transfección y 48 horas después de la infección en el caso de las células HeLa, que la sobreexpresión de SOK1 aumenta de manera estadísticamente significativa comparadas con sus respectivos controles, el porcentaje de células no viables en todas las líneas celulares estudiadas (**figura 12c**).

12a



12b



12c

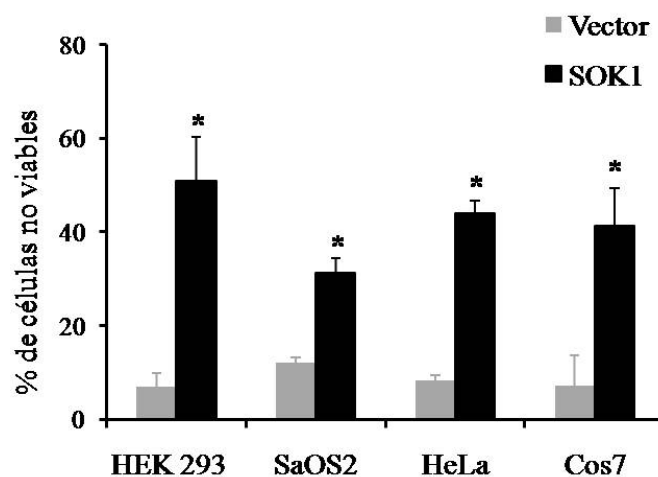


Figura 12.-La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte en diferentes líneas celulares. **12a.-**La sobreexpresión de SOK1 provoca que las células HEK293 se redondeen y se despeguen de la placa de cultivo. Las células fueron transfectadas con el vector de expresión vacío pCMV5 o con el vector que sobreexpresa SOK1, pCMV5-M2-SOK1 y su morfología se observó 72 horas después de la transfección en un microscopio Hoffman de campo claro. **12b.-**La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte celular en la línea HEK293 de manera directamente proporcional al tiempo transcurrido después de la transfección y a la cantidad de proteína expresada. Las células HEK293 se transfectaron con cantidades crecientes del plásmido de expresión de SOK1 (todas las transfecciones se hicieron con la misma cantidad de plásmido, utilizando para igualarla el vector vacío pCMV5) y se evaluó su viabilidad celular transcurridas 48 y 72 horas después de la transfección (izquierda). Extractos proteicos realizados 48 horas después de la transfección se sometieron a *western blot* para determinar los niveles de expresión de SOK1. Se muestra como control de carga GAPDH (derecha). **12c.-**La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte en diferentes líneas celulares. Las líneas celulares HEK293, SaOS2, y Cos7 se transfectaron con el plásmido pCMV5 (Vector) o con el plásmido pCMV5-M2-SOK1 (SOK1). La línea celular HeLa se infectó con adenovirus que sobreexpresan GFP y β -galactosidasa (Vector) o adenovirus que sobreexpresan GFP y SOK1 (SOK1). La viabilidad de las células se determinó a las 48 horas en el caso de las células infectadas y a las 72 horas en el caso de las células transfectadas por exclusión de azul de tripano. * $p < 0.05$ para SOK1 con respecto al vector vacío en cada línea celular.

1.2 Caracterización del tipo de muerte inducida por SOK1.

Una vez demostrado que la sobreexpresión de SOK1 provoca muerte celular nos propusimos caracterizar que tipo de muerte provoca. Para esto estudiamos las características tanto morfológicas como bioquímicas de las células en las que sobreexpresamos SOK1. En cuanto a las características morfológicas, pudimos comprobar que las células infectadas con adenovirus que expresan SOK1(Ad-SOK1), que son fácilmente distinguibles gracias a la coexpresión de GFP, presentan condensación de la cromatina, observada al teñir sus núcleos con Hoescht 33342. Además puede verse fácilmente como estas células presentan vesículas en la membrana plasmática y disminuyen su tamaño (*membrane blebbing and shrinkage*). Ninguna de las dos características, ni la condensación nuclear ni la formación de vesículas en la membrana plasmática aparecen en las células control infectadas con adenovirus que coexpresan GFP y β -galactosidasa (Ad-GFP). Estas dos características son típicas de las células apoptóticas (**figura 13a**).

Bioquímicamente estudiamos uno de los primeros eventos que tiene lugar en la apoptosis, concretamente en la apoptosis que tiene lugar a través de la ruta mitocondrial o la ruta intrínseca, que es la salida de citocromo c de la mitocondria al citoplasma. Mediante *western blot* comprobamos como en las células que sobreexpresan SOK1 se libera citocromo c al citoplasma a niveles similares a los liberados en respuesta al tratamiento con peróxido de hidrógeno. Combinando ambos estímulos, SOK1 y peróxido de hidrógeno, los efectos sobre la cantidad de citocromo c liberado se suman (**figura 13b**).

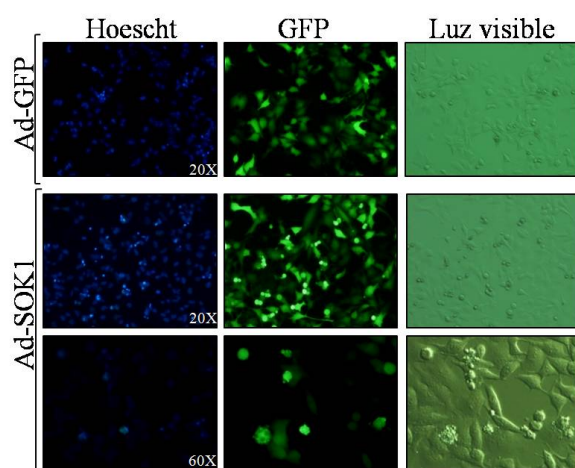
El efecto provocado por la liberación de citocromo c de la mitocondria es la activación de las caspasas. Por ese motivo nos propusimos estudiar la implicación de la actividad de las caspasas en la muerte inducida por SOK1. Para esto, SOK1 se sobreexpresó en células tratadas con dos inhibidores de la actividad de las caspasas, un inhibidor de amplio espectro (z-VAD-fmk), y un inhibidor específico de la caspasa 3 (Ac-DEVD-CHO). Al determinar la viabilidad de las células por exclusión de azul de tripano, pudo comprobarse que ésta se reduce de forma estadísticamente significativa tanto en presencia del inhibidor de amplio espectro como en presencia del inhibidor de la caspasa 3 (**figura 13c**) cuando se compara con la muerte inducida por SOK1. Esto

significa que una parte importante de la muerte que induce SOK1 depende de la actividad de las caspasas.

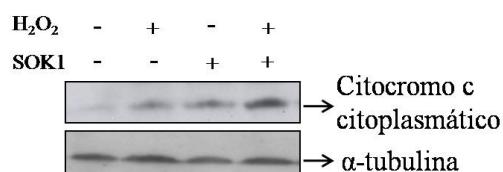
Una vez activadas las caspasas en las células, éstas cortan proteolíticamente sus sustratos, lo que conduce finalmente a la muerte por apoptosis de la célula. Uno de los sustratos de la caspasa 3 es la enzima implicada en la reparación de los ácidos nucleicos PARP, (*poly(ADP-ribose) polymerase*), que es inactivada por corte proteolítico para evitar que su activación provoque un descenso de los niveles de ATP celulares, que deben mantenerse elevados para que la apoptosis pueda desarrollarse correctamente y evitar así la necrosis celular. Mediante *western blot* pudimos comprobar que en células HeLa infectadas con Ad-SOK1, PARP se encuentra inactivada por corte, a diferencia de las células control infectadas con Ad-GFP (**figura 13d**), lo que corrobora que las caspasas están activadas durante el proceso de muerte celular que SOK1 induce.

Todas estas características, tanto las morfológicas, como las bioquímicas, que hemos visto en las células que sobreexpresan SOK1 son típicas de la muerte celular programada o apoptosis, lo que significa que éste es el tipo de muerte que provoca SOK1.

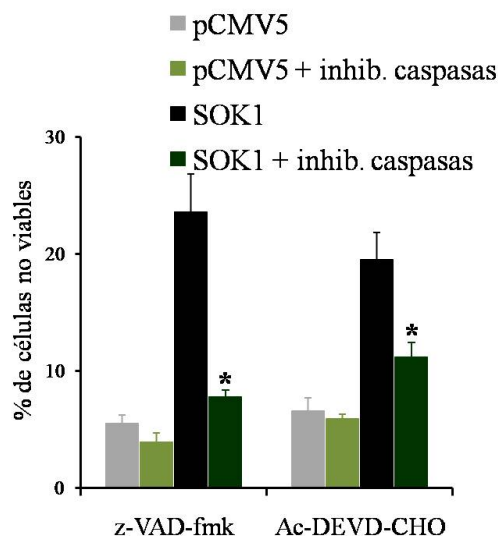
13a



13b



13c



13d

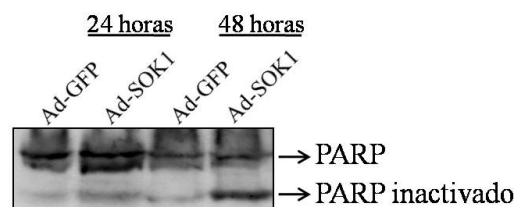


Figura 13.-La muerte inducida por SOK1 presenta características típicas de apoptosis. 13a.-La sobreexpresión de SOK1 provoca condensación de la cromatina y formación de vesículas en la membrana plasmática. Las células infectadas con adenovirus que expresan GFP y β -galactosidasa (Ad-GFP) o GFP y SOK1 (Ad-SOK1) se observaron in vivo tras tinción con Hoescht 33342 (panel izquierda) para apreciar la condensación nuclear. La morfología se evaluó observando GFP (panel central) o en campo claro (panel derecha). **13b.-**La sobreexpresión de SOK1 provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma. Células HEK293 se transfectaron con un plásmido que sobreexpresa SOK1 o con un plásmido control, y se trataron con H_2O_2 500 μ M durante 6 horas (líneas 2 y 4). Transcurridas 36 horas después de la transfección, se determinó la cantidad de citocromo c citoplasmático mediante *western blot*. Se muestra α -tubulina como control de carga. **13c.-**La muerte inducida por SOK1 es dependiente de caspasas. Células HEK293 se transfectaron con un vector de expresión de SOK1 o con el vector vacío en presencia y en ausencia durante todo el experimento de dos inhibidores de caspasas ambos a una concentración 50 μ M (z-VAD-fmk o Ac-DEVD-CHO). El porcentaje de células no viables se determinó 24 horas después de la transfección de las células por exclusión de azul de tripano. * $p < 0.05$ para *SOK1 + inhib. caspasas* comparado con SOK1. **13d.-**La enzima PARP se inactiva por proteólisis durante la muerte inducida por SOK1. Se realizaron extractos proteicos a las 24 y 48 horas después de infectar células HeLa con Ad-GFP y Ad-SOK1. El estado de PARP (activo/inactivo) se determinó mediante *western blot*.

1.3. Implicación de la expresión de SOK1 en la muerte inducida por diferentes tipos de estrés.

Una vez comprobado que la sobreexpresión de SOK1 provoca muerte celular por apoptosis, para verificar su función como una proteína que regula la viabilidad celular, nos propusimos reducir los niveles de SOK1 en la célula, inhibiendo su expresión mediante un shARN diseñado contra esta proteína y clonado en el vector p-SUPER, (sh-SOK1) para luego estudiar la respuesta de estas células sin SOK1 a diferentes tipos de estrés que inducen muerte celular.

1.3.1 La inhibición de SOK1 protege de la muerte en respuesta a anoxia química.

Teniendo en cuenta que el principal estímulo que activa a SOK1 es la anoxia química (Pombo et al, 1997), escogimos en primer lugar este tipo de estrés para determinar el papel de SOK1 en la muerte que provoca este tratamiento. Para ello transfectamos células HEK 293 con sh-SOK1, y con un sh-ARN control dirigido contra la luciferasa (sh-luci). Cinco días después de la transfección, cuando los niveles de SOK1 son más bajos con respecto a las células control, (**figura 14a**) sometimos a las células a tratamiento con anoxia química (cianuro y 2-deoxiglucosa). Transcurridas 3, 6, 9, 12 y 24 horas después del tratamiento estudiamos la viabilidad de las células mediante exclusión de azul de tripano. Los datos obtenidos indican que en las células no tratadas la inhibición de SOK1 no tiene efectos sobre la viabilidad celular. Sin embargo, en las células con bajos niveles de SOK1 y sometidas a anoxia química, incluso tras 24 horas de tratamiento, presentan una viabilidad mucho mayor que las células tratadas transfectadas con sh-luci (**figura 14b**). Estas diferencias observadas entre la viabilidad de las células transfectadas con sh-luci y sh-SOK1 y sometidas a anoxia química son significativas estadísticamente a las 6, 9 12 y 24 horas de tratamiento. De esto podemos concluir que la quinasa SOK1 tiene un papel importante en la muerte celular inducida en respuesta a anoxia química.

Para verificar la autenticidad de los resultados obtenidos y que estos no se deban a efectos inespecíficos del sh-SOK1, diseñamos un mutante de SOK1 clonado en el vector de expresión pCMV5 variando seis nucleótidos en la región contra la que está diseñado específicamente el sh-SOK1, de manera el sh-SOK1 no pueda inhibir la expresión de este mutante de SOK1. A este mutante resistente a la inhibición de le denominó SOK1-R. Las mutaciones introducidas en los nucleótidos de SOK1-R fueron mutaciones silentes, de manera que la secuencia de aminoácidos de SOK1 no se ve alterada, así nos aseguramos de que el fenotipo no varía por cambios en la secuencia de aminoácidos de la quinasa. La sobreexpresión de SOK1-R, pero no la sobreexpresión de SOK1 redujo la capacidad del sh-SOK1 de inhibir la muerte celular en respuesta a anoxia química de manera que las diferencias con respecto al control (células transfectadas con sh-luci y sin tratar) no son significativas cuando se aplica el test estadístico de Mann-Withney (**figura 14c**). Mediante *western blot* comprobamos que efectivamente el sh-SOK1 es capaz de inhibir la sobreexpresión de SOK1 pero no la de SOK1-R (**figura 14d**). Así, gracias a la expresión de esta forma de SOK1 hemos

conseguido revertir el fenotipo del sh-SOK1. Demostrando así de forma definitiva que SOK1 juega un papel importante en la muerte inducida en respuesta a anoxia química.

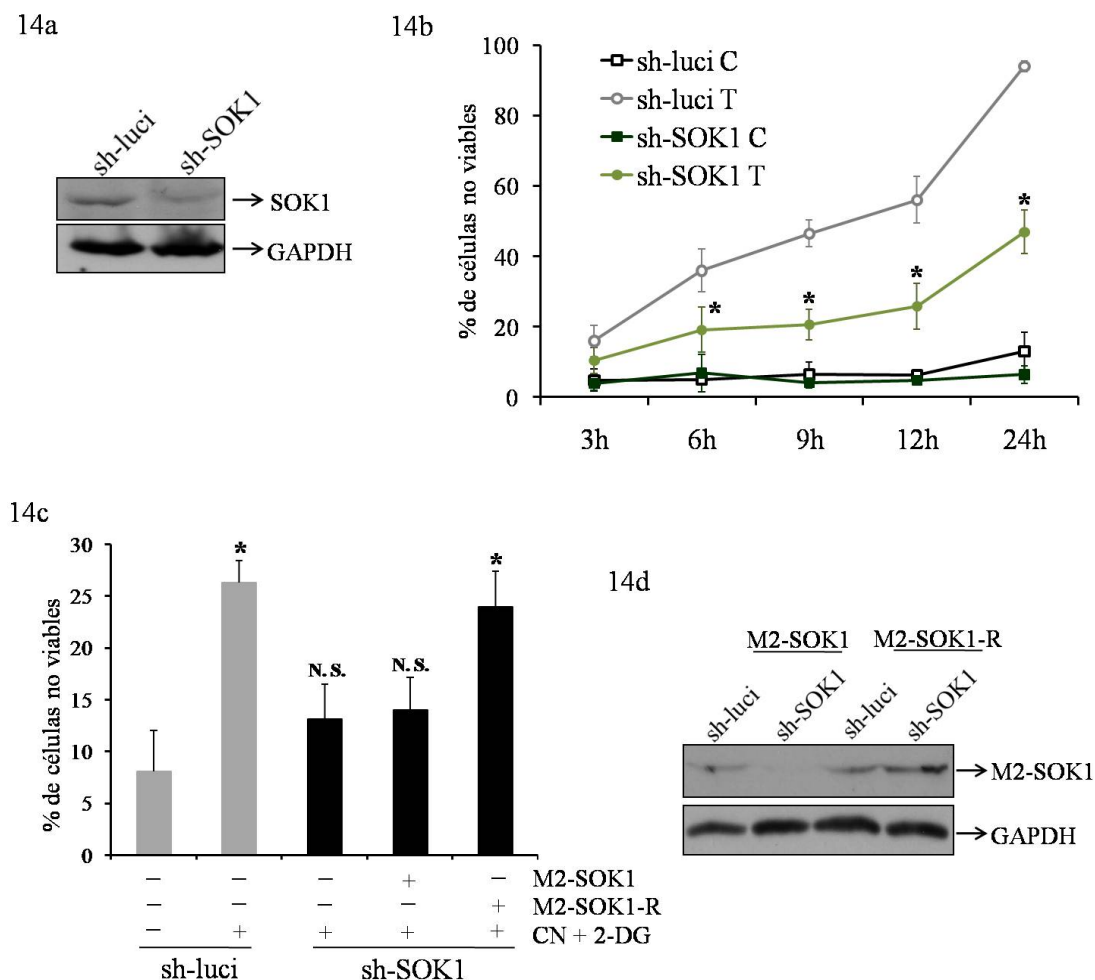


Figura 14.-La inhibición de SOK1 protege frente a la muerte inducida por anoxia química.

14a.- Se transfectaron células HEK293 con un plásmido derivado del pSUPER donde se clonó un sh-ARN dirigido contra la luciferasa (sh-luci) o dirigido contra SOK1 (sh-SOK1). Transcurridos cinco días tras la transfección se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de SOK1. GAPDH se muestra como control de carga. **14b.-** La disminución de SOK1 aumenta la supervivencia celular frente a la anoxia química. Se transfectaron células HEK293 con sh-luci y sh-SOK1. Cinco días después un grupo se dejó sin tratar (Control) y otro grupo se sometió a tratamiento con anoxia química (cianuro y 2-deoxiglucosa ambos 5 mM) (Tratado). Se evaluó el porcentaje de muerte celular por exclusión de azul de tripano a los tiempos indicados. En la gráfica se muestran los resultados con la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ para *sh-SOK1 Tratado* con respecto a *sh-luci Tratado*. **14c.-** Los efectos del sh-SOK1 son consecuencia de la disminución de SOK1. Las células transfectadas con sh-luci y sh-SOK1 se transfectaron de nuevo con SOK1 y un mutante de SOK1 (SOK1-R) resistente a la inhibición por parte del sh-SOK1. Se sometieron a anoxia química durante 6 horas y se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano. En la gráfica se muestran los resultados de tres experimentos diferentes con las desviaciones estándar. * $p < 0.05$ y N.S. (diferencias no significativas) para todas las condiciones con respecto al control (sh-luci sin tratar). **14d.-** Western blot donde se muestra la incapacidad del sh-SOK1 para inhibir la expresión de SOK1-R. Se muestra GAPDH como control de carga.

1.3.2 La inhibición de la expresión de SOK1 protege de la muerte en respuesta a estrés osmótico.

Una vez que comprobamos que la disminución de los niveles de la quinasa SOK1 en células HEK293 aumenta la supervivencia de éstas en respuesta a anoxia química, nos propusimos determinar la implicación de SOK1 en la muerte en respuesta a otro tipo de estrés. Decidimos estudiar un tipo de estrés en respuesta al cual no estuviese descrita la activación de la quinasa. Elegimos estrés hiperosmótico. Al igual que en el caso de la anoxia química, transcurridos cinco días después de la transfección con el sh-ARN dirigido contra la luciferasa, o el sh-ARN dirigido contra SOK1, cuando los niveles de esta última son más bajos (**figura 15a**), sometimos a las células a estrés hiperosmótico y estudiamos su viabilidad por exclusión de azul de tripano. El resultado fue similar al obtenido en respuesta a anoxia química. La inhibición de SOK1, protege de la muerte en respuesta a estrés osmótico (**figura 15b**). Esta protección es significativa estadísticamente tras 24 y 30 horas de tratamiento comparando los porcentajes de muerte de las células transfectadas con sh-luci y sh-SOK sometidas a estrés osmótico.

Aunque está descrito que el estrés hiperosmótico no activa a corto plazo a SOK1 (Pombo et al, 1997), hay trabajos que demuestran que el estrés osmótico provoca a medio/largo plazo la aparición en la célula de especies reactivas de oxígeno (Kultz, 2005). Teniendo en cuenta los datos reflejados en estos trabajos nos propusimos determinar si SOK1 se activa en respuesta a estrés osmótico tras tiempos más largos de tratamiento que los estudiados hasta el momento. Decidimos estudiar también si la activación de SOK1, en caso de producirse, depende de la formación de ROS en las células. Para esto sometimos a las células a dos y seis horas de estrés hiperosmótico en presencia y en ausencia de dos tipos diferentes de antioxidantes que evitan que se acumulen ROS en las células, PDTC (*Pyrrolidinedithiocarbamate*) y NAC (*N-Acetyl-L-Cystein*). Transcurrido el tiempo de tratamiento estudiamos la activación de SOK1 mediante un ensayo de actividad quinasa. En este ensayo pudimos comprobar que la actividad quinasa de SOK1 aumenta tanto tras dos horas como tras seis horas de estrés osmótico. Podemos concluir también de este ensayo que la activación de SOK1 en respuesta a estrés osmótico se produce a través de la formación de ROS en las células, ya que esta activación no tiene lugar, o es menor, en presencia de los antioxidantes PDTC y NAC (**figura 15c**).

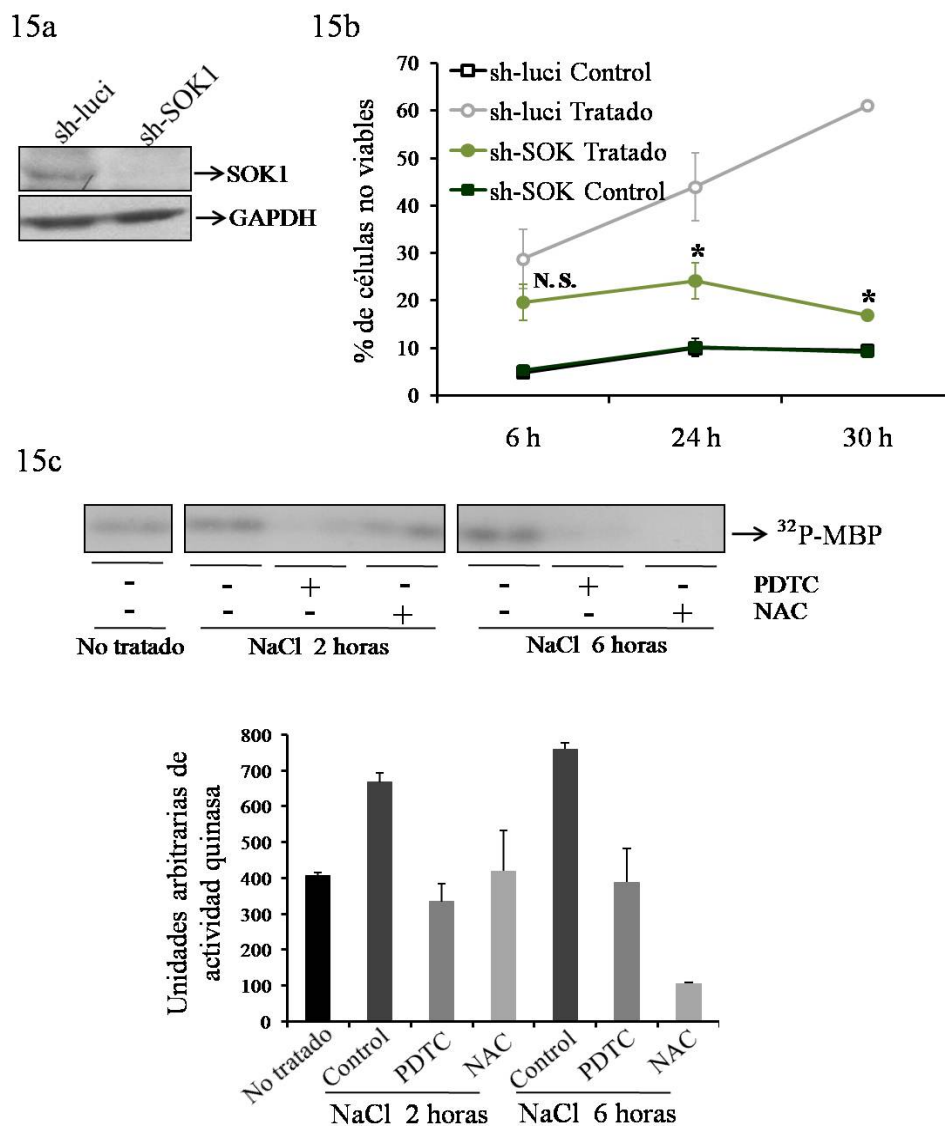
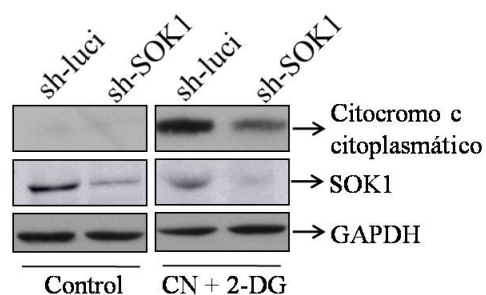


Figura 15.-La inhibición de SOK1 protege frente a la muerte inducida por estrés osmótico
15a.- Inhibición de los niveles de SOK1 mediante sh-ARN. Se transfectaron células HEK293 con sh-luci y sh-SOK1. Cinco días después de la transfección se realizaron extractos proteicos para determinar mediante *western blot* los niveles de SOK1. GAPDH se muestra como control de carga.
15b.- La reducción de los niveles de SOK1 aumenta la supervivencia celular frente al estrés osmótico. Transcurridos cinco días después de la transfección de células HEK293 con sh-luci o sh-SOK1, un grupo se dejó sin tratar (Control) y otro se mantuvo durante 2 horas con medio suplementado con NaCl 400 mM (Tratado), a continuación se incubaron con medio isosmótico durante 6, 24 y 36 horas. Transcurridos estos tiempos el porcentaje de células no viables se determinó mediante exclusión de azul de tripano. N.S. (diferencias no significativas) y * $p < 0.05$ para *sh-SOK1 tratado* con respecto a *sh-luci tratado*.
15c.- Tiempos de tratamiento medios/largos con estrés osmótico provocan la activación de SOK1 a través de la formación de ROS en la célula. Células HEK293 se pretrataron durante 2 horas con una concentración 5 mM de NAC y durante 30 minutos con una concentración 100 μ M de PDTC. A continuación se mantuvieron 2 horas en medio suplementado con NaCl 400 mM y por último se incubaron en medio isosmótico durante 2 y 6 horas. Durante todo el proceso se mantuvieron en presencia de los antioxidantes NAC y PDTC. Se hicieron extractos proteicos y se inmunoprecipitaron para estudiar la activación de SOK1. En el panel superior vemos las bandas correspondientes a la fosforilación de la MBP por parte de SOK1 en un ensayo de actividad quinasa. En el panel inferior se muestra la cuantificación de la fosforilación de la MBP realizada en un contador de desintegración de partículas β .

1.3.3 Caracterización del tipo de muerte frente al que protege la inhibición de SOK1.

La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte celular en diferentes líneas y esta muerte presenta características de apoptosis. Coherentemente con este hecho, la inhibición de SOK1 en células HEK 293 aumenta la supervivencia de estas células en respuesta a diferentes tipos de estrés. Estos tipos de estrés pueden provocar muerte tanto por necrosis como por apoptosis (Zong et al, 2006). Por este motivo nos propusimos determinar frente a qué tipo de muerte protege la inhibición de SOK1. Para esto, utilizando una población de células control transfectadas con sh-luci y una población de células donde SOK1 está inhibido por transfección con sh-SOK1, estudiamos la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma en respuesta a anoxia química. El hecho de que este tratamiento provoque liberación de citocromo c de la mitocondria nos indica que en estas condiciones, por lo menos una parte de la muerte celular tiene lugar por apoptosis. Se comprobó además, que en las células donde están disminuidos los niveles de SOK1 esta liberación es mucho menor, indicado que SOK1 protege frente la apoptosis inducida por la anoxia química (**figura16a**). Por otro lado, estudiamos en ambas poblaciones celulares la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo en respuesta a anoxia química, estaurosporina y triton-X-100. La LDH es una enzima citoplasmática que se libera al medio tras la ruptura de la membrana celular en caso de necrosis. El Triton-X-100 es un detergente que induce necrosis celular por ruptura de las membranas de la célula (control positivo recomendado por el fabricante del kit, Roche Diagnostics). Gracias a la medición de la liberación de LDH al medio de cultivo comprobamos que la necrosis provocada en respuesta tanto la anoxia química como a estaurosporina es mínima comparada con la provocada por el triton-X-100, y que además la inhibición de SOK1 mediante sh-RNA no protege frente a la necrosis inducida por ninguno de los tratamientos (**figura16b**). Esto significa que la muerte inducida en nuestro sistema celular en respuesta a anoxia química y estaurosporina es fundamentalmente apoptosis, y por lo tanto es este tipo de muerte frente al que protege SOK1.

16a



16b

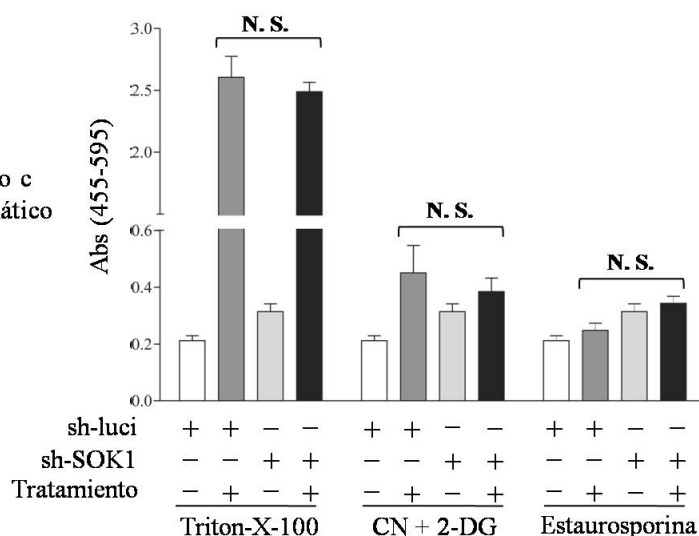


Figura 16.-La disminución de los niveles de SOK1 protegen frente a la muerte celular por apoptosis. 16a.-La disminución de SOK1 reduce la liberación de citocromo c al citoplasma en respuesta a CN y 2-DG. Las células HEK293 se sometieron a 6 horas de tratamiento con CN y 2-DG ambos 5 mM cinco días después de ser transfectadas con sh-luci o sh-SOK1. Con estas células se realizaron extractos proteicos y se determinó la cantidad de citocromo c citoplasmático mediante *western blot* (panel superior). Se muestra la disminución de los niveles de SOK1 (panel central) y los niveles de GAPDH como control de carga (panel inferior). **16b.-**La inhibición de SOK1 no protege a las células de la muerte por necrosis. Células HEK293 transfectadas con sh-luci o sh-SOK1 se dejaron sin tratar o se sometieron a tratamiento con CN y 2-DG ambos 5 mM durante 6 horas. A continuación se determinaron los niveles de LDH liberada al medio de cultivo. Como control positivo de necrosis se añadió en el medio de cultivo el 1% de Triton-X-100, y como control negativo estaurosporina 2 μ M. N.S. (diferencias no significativas) para células tratadas transfectadas con sh-luci con respecto a las células tratadas transfectadas con sh-SOK1.

2. REGULACIÓN DE SOK1.

Todas las proteínas existentes en las células están implicadas o participan en la regulación de una o varias funciones de éstas. Sin embargo, las proteínas no llevan a cabo el control de estas funciones celulares de manera independiente unas de las otras. Por ejemplo, en el caso de las quinasas, su actividad y función puede estar regulada por otras quinasas o fosfatasa que modulan su actividad. De hecho, en eso consisten las rutas de señalización celular, en la transmisión y amplificación de información en respuesta a un determinado estímulo. Esto se consigue gracias a la interacción entre diferentes proteínas que van pasando información de unas a otras provocando un determinado efecto biológico en la célula.

Recientemente se describió la interacción de SOK1 con la proteína GM130 y con 14-3-3 ζ , esta última además se caracterizó como uno de sus sustratos en el aparato de Golgi. Esta ruta de la que forma parte SOK1 interviene en el mantenimiento de la estructura de este orgánulo (Preisinger et al, 2004). Sin embargo, no se conoce la ruta que puede llevar a la inducción de muerte celular tras la sobreexpresión de SOK1, o al aumento de la supervivencia en respuesta a estrés tras la disminución de sus niveles celulares. Por este motivo, quisimos encontrar proteínas que puedan participar en la regulación de este aspecto.

2.1 Caracterización de SOK1 como sustrato de la caspasa 3.

Como ya se ha comentado en la introducción, las caspasas son enzimas que poseen gran relevancia en la muerte celular por apoptosis. En mamíferos hay actualmente identificados unos catorce miembros en esta familia de proteasas, pero parece ser que no todas están implicadas en procesos relacionados con muerte celular. Las caspasas una vez activadas llevan a cabo su función cortando otras proteínas normalmente en residuos de ácido aspártico.

Son numerosos los casos de quinasas, que pueden estar relacionadas con la muerte celular, que se ha descrito que son sustrato de las caspasas, y cuyo corte conlleva normalmente a un incremento de su actividad quinasa. Es el caso, por ejemplo, de las quinasas Mst, Mst1, Mst2, Mst3 y Mst4. En el caso de Mst1, su corte por la caspasa fue descrito en el año 1998 (Graves et al, 1998; Lee et al, 1998). Además, en el caso de esta quinasa se ha comprobado que una vez cortada, el dominio catalítico ejerce un bucle de retroalimentación positivo que puede activar las caspasas amplificando así la señal de muerte (Graves et al, 1998). Años más tarde se publicó la regulación por parte de las caspasas para otros miembros de las proteínas Mst, concretamente Mst2 (Deng et al, 2003); Mst3 (Huang et al, 2002); y con respecto a Mst4, los datos a día de hoy son contradictorios (Dan et al, 2002; Huang et al, 2002; Li et al, 2001).

Teniendo en cuenta que SOK1 está relacionada con procesos de muerte celular dependiente de caspasas (**figuras 13c y 13d**) y que además las proteínas filogenéticamente más próximas a ella son sustrato de estas enzimas, nos propusimos estudiar si la caspasa 3 puede cortar a SOK1. Para esto, introdujimos la región

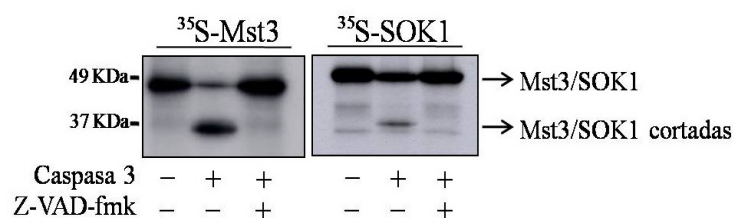
codificante de SOK1 en un plásmido con un promotor T7 que nos permitiera expresarla *in vitro*. Una vez hecho el constructo, expresamos la proteína con un kit para traducción *in vitro* en presencia de metionina marcada radiactivamente con ^{35}S e incubamos parte del producto de la reacción con caspasa 3 humana activa recombinante. Como control positivo realizamos en paralelo la traducción y el corte de Mst3. Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida y exposición con una película de autorradiografía comprobamos que la caspasa 3 corta a SOK1 dando lugar a una banda de entre 35-38 kDa. Para asegurarnos de la especificidad del corte por parte de la caspasa, llevamos a cabo una reacción en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk en la que SOK1 no fue cortada.

Una vez que comprobamos que la caspasa 3 puede cortar por lo menos parcialmente a SOK1, quisimos determinar el lugar exacto en el que tiene lugar el corte. Las caspasas reconocen para su corte residuos de ácido aspártico (D) en sus sustratos. En SOK1 no existe ninguna secuencia consenso de corte de las que hasta ahora se han descrito para la caspasa 3, sin embargo existe una alta homología con las secuencias donde son cortadas otras proteínas próximas filogenéticamente a SOK1, estas secuencias se encuentran entre los aminoácidos 303 y 312. Concretamente en esta zona hay cuatro residuos de ácido aspártico que ocupan las posiciones 303, 305, 307 y 312. Para determinar si el corte tiene lugar en alguno de estos residuos aminoacídicos mutamos estos cuatro residuos de ácido aspártico a asparragina (N) utilizando un kit de mutagénesis dirigida. Teniendo en cuenta que el corte puede tener lugar en más de un lugar, construimos un mutante en el que los cuatro aminoácidos se cambiaron por asparragina (SOK1^{D4N}). Más cerca del extremo C-terminal de SOK1, concretamente en la posición 347 existe otro ácido aspártico que también mutamos para verificar que no es aquí donde se produce el corte (**figura 17b**), y además de esta forma testamos todos los residuos de ácido aspártico existentes en SOK1. Una vez contruidos los mutantes de SOK1 llevamos a cabo la traducción *in vitro* y la posterior incubación con caspasa 3. Ninguno de los mutantes originados a partir de SOK1 es resistente al corte por esta caspasa, lo que significa que el corte de SOK1, al menos *in vitro*, es independiente de la presencia de los residuos de ácido aspártico (**figura17c**).

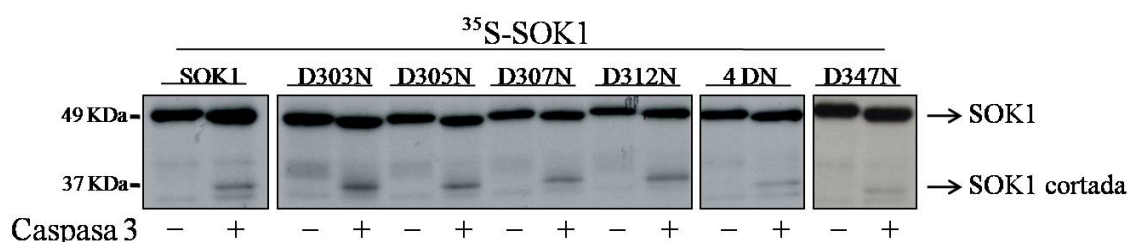
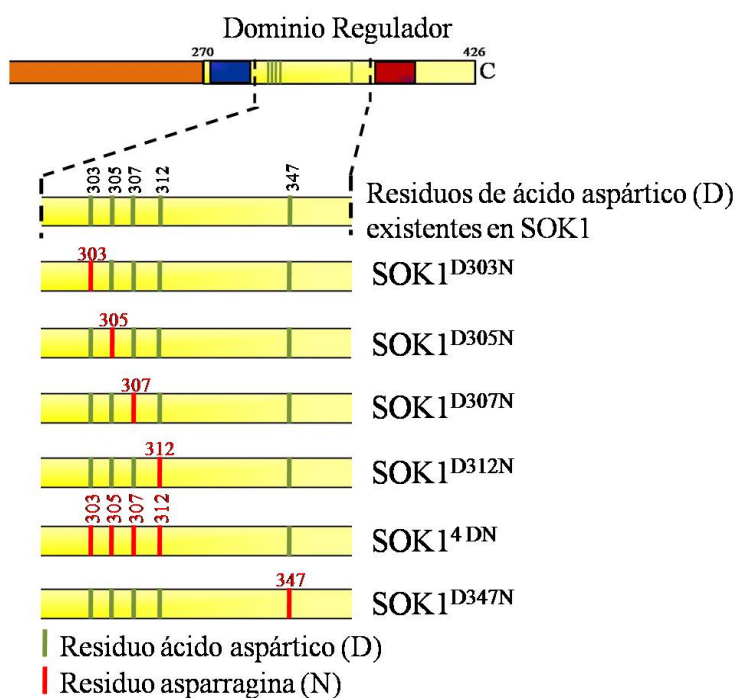
Teniendo en cuenta que SOK1 se activa rápidamente (40 minutos) en condiciones de estrés extremo (Pombo et al, 1997) y considerando que para otras quinasas se relacionó su actividad catalítica con el hecho de ser cortadas por caspasas,

una vez que comprobamos que SOK1 puede ser sustrato de estas enzimas, quisimos determinar si su activación también depende de ellas. Para esto realizamos un ensayo de actividad quinasa en células no tratadas y células en las que estimulamos la actividad de SOK1 por tratamiento con anoxia química, ambas condiciones en presencia y en ausencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk. El inhibidor de las caspasas no redujo la activación de SOK1 en respuesta a cianuro y 2-deoxiglucosa, lo que significa que aunque las caspasas puedan cortar a SOK1, su activación a tiempos cortos es independiente de la actividad de estas enzimas (**figura 17c**).

17a



17b



17c

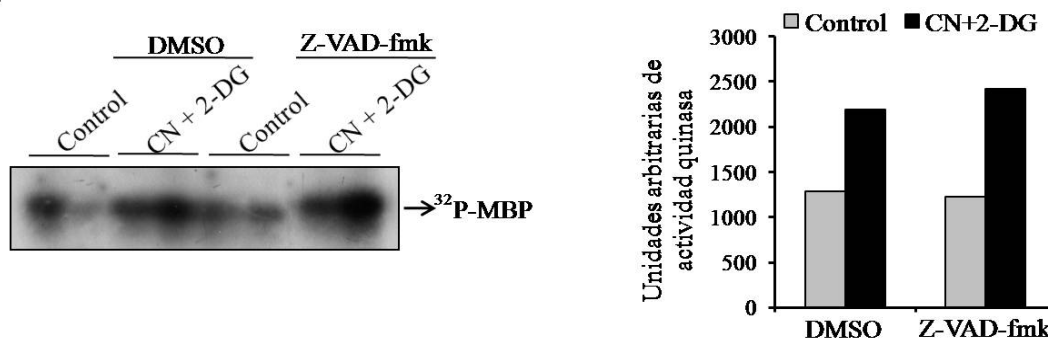


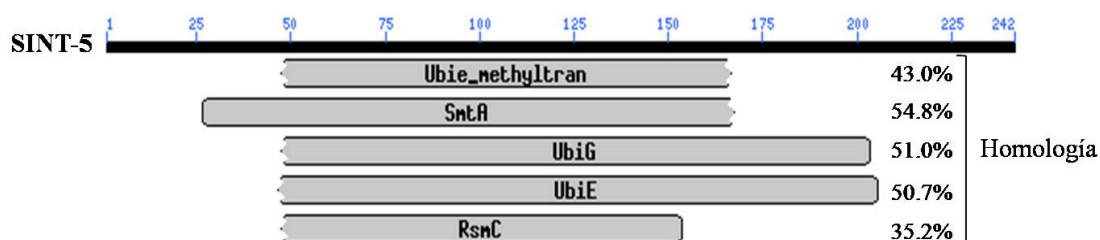
Figura 17.-SOK1 es un sustrato de la caspasa 3 pero su activación a tiempos cortos es independiente de la actividad de estas enzimas. **17a.-**SOK1 es un sustrato de la caspasa 3. Tanto SOK1 como Mst3 (utilizada como control positivo) se tradujeron *in vitro* en presencia de ^{35}S -metionina y se incubaron en presencia y en ausencia de 100 ng de caspasa 3 y del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk 1 μM . A continuación se sometieron a SDS-PAGE y los geles se secaron y se expusieron con una película de autorradiografía. **17b.-**Esquema de los mutantes contruídos mediante mutagénesis dirigida para localizar el lugar de corte de la caspasa 3 en SOK1 (panel superior). Todos estos mutantes se tradujeron en presencia de ^{35}S -metionina y se incubaron en presencia o en ausencia de 100 ng de caspasa 3. Tras la incubación con la caspasa se sometieron a SDS-PAGE y los geles se secaron y se expusieron con una película de autorradiografía (panel inferior). **17c.-** La activación de SOK1 es independiente de la actividad de las caspasas. Células HEK293 se dividieron en dos grupos, control o tratadas con CN y 2-DG, ambos 5 mM durante 40 minutos, en presencia y en ausencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk 50 μM . A continuación se hicieron extractos proteicos de las células y se inmunoprecipitaron para estudiar la activación de SOK1. En el panel de la izquierda se muestra la fosforilación de la MBP por parte de SOK1 correspondiente al ensayo de actividad quinasa. En el de la derecha se muestra la cuantificación de esta fosforilación en un contador de desintegración de partículas β .

2.2. Búsqueda de nuevas proteínas que interaccionen con SOK1.

Para estudiar y caracterizar aspectos de la función y de la regulación de SOK1, se buscaron proteínas que interaccionaran con ella a través de un sistema de doble híbrido realizado en levaduras utilizando como cebo a SOK1. El sistema de doble híbrido de Elledge se realizó en colaboración con el doctor Tomas Force, del Cardiomyocyte Biology Laboratory, New England Medical Center, Tufts University, Boston. Gracias a esta técnica se encontraron varios clones que codificaban proteínas con las que SOK1 podría interaccionar. Estos clones se secuenciaron y debido al tipo de proteína que codificaban los estudios se centraron en el clon número 5. Se comprobó que este clon codificaba una proteína con un ARNm de 1588 pb, en el que se encuentran un codón de iniciación, un codón de parada y una cola de poli-A. La proteína consta de 242 aminoácidos y por lo tanto un peso molecular de

aproximadamente 28 KDa (**figura 18**). A la proteína codificada por este clon se le denominó SINT-5 (*SOK-1 interactor number 5*). Los motivos por los que se decidió estudiar este clon, fueron el hecho de que comparando la secuencia de SINT-5 con otras proteínas existentes en las bases de datos, esta guarda una alta homología con metiltransferasas, concretamente con metiltransferasas de ubiquinona (**figura 18**). En este sentido, se comprobó que en SINT-5 aparecen dos de las tres secuencias consenso conservadas en metiltransferasas caracterizadas en un trabajo del año 1994 (Kagan et al, 1994). Siendo las ubiquinonas proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, que también intervienen en el mantenimiento del potencial de oxido-reducción celular gracias a su capacidad para actuar como antioxidantes liposolubles, y teniendo en cuenta que SOK1 se activa precisamente por ROS, se pensó que ambas proteínas podrían estar relacionadas a este nivel.

18a



18b

2	cgg ctc cgg tgt cat ggc cgg ctc cta ccc tga agg tgc acc tgc	46
47	agt cct cgc cga taa gag gca gca gtt cgg aag ccg gtt cct gag	91
92	aga tcc ggc gcg cgt ctt cca cca taa tgc ctg gta atc act ctg	136
137	ccc ctt cgc ccg gcc tgt cgc tga ccc tct gtc ccg ccg cct cgg	181
182	agc act ccg aaa agc ccc tga ccg ccg gcc acg agt caa gct gcc	226
227	cta ccc gag gca ctc tcc aag ggg aga gaa act cct agg cca gcg	271
272	act cac cct gcc cgc agc cag gac gtg agg ccc cta agc tgc ccg	316
317	ttt gat ttt ctc agg gac aat gtg gag tgg tcg gaa gag caa gcc	361
362	gcg gtg gcg gag aga aaa gtc cag gag aac agt atc cag cgg gtg	406
407	tgc cag gag aaa caa gtt gat tat gag atc aat gcc cac aaa tac	451
452	tgg aat gac ttc tac aaa atc cac gaa aat ggg ttt ttc aag gat	496
497	aga cat tgg ctt ttt acc gaa ttc cct gag ctg gca cct agc caa	541
542	aat caa aat cat ttg aag gac tgg ttc ttg gag aac aag agt gaa	586
587	gta cct gaa tgt aga aac aat gag gat gga cct ggt tta ata <u>atg</u>	631
		1
632	gaa gaa cag cac aag tgt tct tcg aag agc ctt gaa cat aaa aca	676
2	E E Q H K C S S K S L E H K T	16
677	cag aca cct cct gtg gag gag aat gta act cag aaa att agt gac	721
17	Q T P P V E E N V T Q K I S D	31
722	ctg gaa att tgt gct gat gag ttt cct gga tcc tca gcc acc tac	766
32	L E I C A D E F P G S S A T Y	46
767	cga ata ctg gag gtt ggc tgt ggt gtg gga aac aca gtc ttt cca	811
47	R I L E V G C G V G N T V F P	61
812	att tta caa acg aac aat gac cca gga ctc ttt gtt tat tgc tgt	856
62	I L Q T N N D P G L F V Y C C	76
857	gat ttt tct tcc aca gct ata gaa ctg gtc cag aca aat tca gaa	901
77	D F S S T A I E L V Q T N S E	91
902	tat gat cct tct cgg tgt ttt gcc ttt gtt cac gac ctg tgt gat	946
92	Y D P S R C F A F V H D L C D	106
947	gaa gag aag agt tac cca gtg ccc aag ggc agt ctt gat att atc	991
107	E E K S Y P V P K G S L D I I	121
992	att ctc ata ttt gtt ctt tca gca att gtt cca gac aag atg cag	1036
122	I L I F V L S A I V P D K M Q	136
1037	aag gct atc aac agg ctg agc agg ctt ctg aaa cct ggc ggg atg	1081
137	K A I N R L S R L L K P G G M	151
1082	atg ctt ctg cga gat tac ggc cgc tat gac atg gct cag ctt cgg	1126
152	<u>M L L</u> R D Y G R Y D M A Q L R	166
1127	ttt aaa aaa ggt cag tgt cta tct gga aat ttc tac gtg aga ggt	1171
167	F K K G Q C L S G N F Y V R G	181
1172	gat gga acc aga gtt tac ttc ttc aca caa gag gaa ctg gac acg	1216
182	D G T R V Y F F T Q E E L D T	196
1217	ctt ttc acc act gct gga ctg gaa aaa gtt cag aac ctg gtg gat	1261
197	L F T T A G L E K V Q N L V D	211
1262	cgc cga ctg cag gtg aac cga gga aag caa ctg aca atg tac cgg	1306
212	R R L Q V N R G K Q L T M Y R	226
1307	gtt tgg att cag tgc aaa tac tgc aag ccc ctt ctg tcc agc acc	1351
227	V W I Q C K Y C K P L L S S T	241
1352	agc <u>tga</u> gag gca cct gct gcc aac acg atg caa gcc cat tgt gtt	1396
242	S *	
1397	tcc ggg ctt ttt taa aaa aaa aat tgt agc act ggg cgt ggt gca	1441
1442	tgc ctg taa tcc cag cca ctc agg agg ctg agg ccg gga gga tcc	1486
1487	att gag ccc agc agt cca acc tgg gca aaa tag tga gag acc ctg	1531
1532	tat ctg aaa gta ata ata aaa ata aaa aat att aaa aaa aaa aaa	1576
1577	aaa aaa aaa aaa	1588

18c

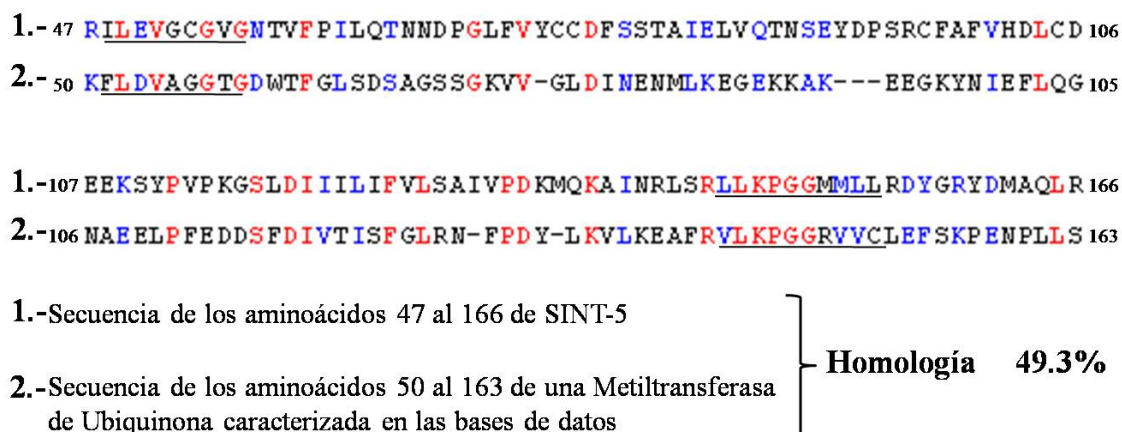


Figura 18.- Grado de homología de SINT-5 con diferentes metiltransferasas. Secuencia del ARNm y de la pauta de lectura. 18a.- Comparación de SINT-5 con proteínas existentes en las bases de datos. Se ve como SINT-5 presenta mayor homología con diferentes metiltransferasas; Ubie_methyltran. (*ubiE/COQ5 methyltransferase family*), SmtA (*S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase*), UbiG (*3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase*), UbiE, (*ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase*) RsmC (*Ribosomal RNA small subunit methyltransferase C*). **18b.-** Secuencia de las 1588 pb de que constituyen el ARNm de SINT-5. También se muestra la traducción en aminoácidos de la parte codificante. Rodeado en un círculo rojo aparece el codón de iniciación de la traducción (ATG) y en un círculo azul el codón de terminación (TGA). Aparecen subrayadas las dos secuencias consenso conservadas en diferentes proteínas caracterizadas como metiltransferasas. **18c.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de SINT-5 y un miembro de la familia de metiltransferasas implicados en la síntesis de ubiquinona E/Coenzima Q5. En rojo se muestran los nucleótidos idénticos entre las dos secuencias y en azul los equivalentes. Aparecen subrayadas en ambos casos las secuencias conservadas entre metiltransferasas. Ambas proteínas presentan una homología del 49,3%.

2.2.1 Mettl2a (Methyltransferase like 2a) Y Mettl2b (Methyltransferase like 2b).

Al introducir en las bases de datos el número de acceso de SINT-5 (clone MGC:12209) ésta aparece como una proteína de *Homo sapiens* a la que se denomina Mettl2a (*Methyltransferase like 2a*). Si se realiza la búsqueda utilizando el término Mettl, además de diferentes homólogos de otros organismos (*Mus musculus*, *Xenopus tropicalis*, *Macaca fascicularis*) aparece otra proteína de *Homo sapiens* denominada Mettl2b (*Methyltransferase like 2b*). Según la descripción de ambas proteínas, éstas se localizan en cromosomas diferentes (Msttl2a en el cromosoma 17 y Msttl2b en el cromosoma 7), el ARNm de Mettl2a consta de 1590 pb, que codifican una proteína de 242 aminoácidos y el ARNm de Mettl2b consta de 2192 pb que codifican una proteína

de 378 aminoácidos. Sin embargo, si comparamos la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas, podemos comprobar que SINT-5 (Mettl2a) es idéntica a los últimos 242 aminoácidos de Mettl2b. Solamente se diferencian en que esta última posee 136 aminoácidos más (**figura 19**).

METTL2A

Denominación oficial: METTL2A **Nombre:** methyltransferase like 2A [*Homo sapiens*]

Localización cromosómica: 17q23.2

Gen: 339175

METTL2B

Deniminación oficial: METTL2B **Nombre:** methyltransferase like 2B [*Homo sapiens*]

Localización cromosómica: 7q32.1

Gen: 55798

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA:

Mettl2b	1	MAGSYPEGAPAILADKRQQFGSRFLSDPARVFHHNAWDNVEWSEEQAAAA ERKVQENSIQKVC
Mettl2b	64	QEKQVDYEINAHKYWPDFYKIHENGFFKDRHWLFTFPELAPSQNQNHLDWFLENKSEVC EC
Mettl2a	1	MEEQHKCSSKSLEHKTQTPPVEENVTKISDLEICADEFPGSSATYRILEVGCGVG
Mettl2b	127	RNNEDGPGLIMEEQHKCSSKSLEHKTQTPPVEENVTKISDLEICADEFPGSSATYRILEVGCGVG
Mettl2a	57	NTVPILQTNNDPGLFVYCCDFSSTAIELVQTNSEYDPSRCFAFVHDLCDDEKSYVPKGSGLDIILI
Mettl2b	193	NTVPILQTNNDPGLFVYCCDFSSTAIELVQTNSEYDPSRCFAFVHDLCDDEKSYVPKGSGLDIILI
Mettl2a	120	FVLSAVVPDKMQKAINRLSRLKPGGMVLLRDYGRYDMAQLRFKKGQLRFKKGQCLSGNFYVR
Mettl2b	256	FVLSAVVPDKMQKAINRLSRLKPGGMVLLRDYGRYDMAQLRFKKGQLRFKKGQCLSGNFYVR
Mettl2a	181	GDGTRVYFFTQEELDTLFTTAGLEKVQNLVDRRLQVNRGKQLTMYRVWIQCKYCKPLLSSTS
Mettl2b	317	GDGTRVYFFTQEELDTLFTTAGLEKVQNLVDRRLQVNRGKQLTMYRVWIQCKYCKPLLSSTS

Figura 19.-Comparación entre la nomenclatura, localización cromosómica y secuencia aminoacídica de Mettl2a (SINT-5) y Mettl2b. En rojo, se muestra la secuencia de aminoácidos que diferencia a Mettl2b de Mettl2a, en negro la parte de su secuencia en la que presentan una homología del 100%.

2.2.2 Estudio de la expresión de SINT-5 (Mettl2a) y Mettl2b mediante *northern blot*.

Teniendo en cuenta la gran similitud existente entre SINT-5 (Mettl2a) y Mettl2b, y considerando el hecho de que solamente se diferencian en que ésta última posee 136 aminoácidos más, a pesar de que está descrito que sus genes se encuentran en cromosomas diferentes consideramos la posibilidad de que SINT-5 no fuera una proteína en sí misma, si no solamente un fragmento de Mettl2b. Para descartar esta hipótesis nos planteamos estudiar la presencia o no de su ARNm en diferentes líneas

celulares mediante *northern blot*. Para esto extrajimos ARN de las líneas HEK293, SaOS2 y HCA2 (línea celular de fibroblastos humanos inmortalizados con telomerasa), y tras la electroforesis y transferencia a membrana evaluamos la presencia del ARN de SINT-5 (Mettl2a) y Mettl2b hibridando la membrana con una sonda diseñada para unirse a una zona común en ambas y marcada radiactivamente. Nuestros resultados muestran que la sonda de SINT-5 hibrida con el ARN de las tres líneas celulares dando lugar a dos bandas de reacción en cada una de ellas (**figura 20**, panel derecho). Al estimar el tamaño de estas bandas por comparación con el tamaño del ARN de 28s y 18s (**figura 20**, panel izquierdo), comprobamos que la banda de mayor tamaño consta de unas 2100 pares de bases (que se corresponde con el ARNm de Mettl2b) y la de menor tamaño está constituida por unas 1500 pb, que se corresponden con el tamaño del ARNm de SINT-5 o Mettl2a (**figura 20**, panel derecho). Por lo tanto, podemos concluir que en las tres líneas celulares estudiadas, hay dos transcritos diferentes que se corresponden en tamaño con el ARNm de SINT-5 (Mettl2a) y con el ARNm de Mettl2b. Esto, aunque no descarta la posibilidad de que ambas proteínas procedan del procesamiento alternativo del ARN transcrito a partir de un mismo gen, si nos indica que existen dos ARNm diferentes que pueden dar lugar a dos proteínas también diferentes.

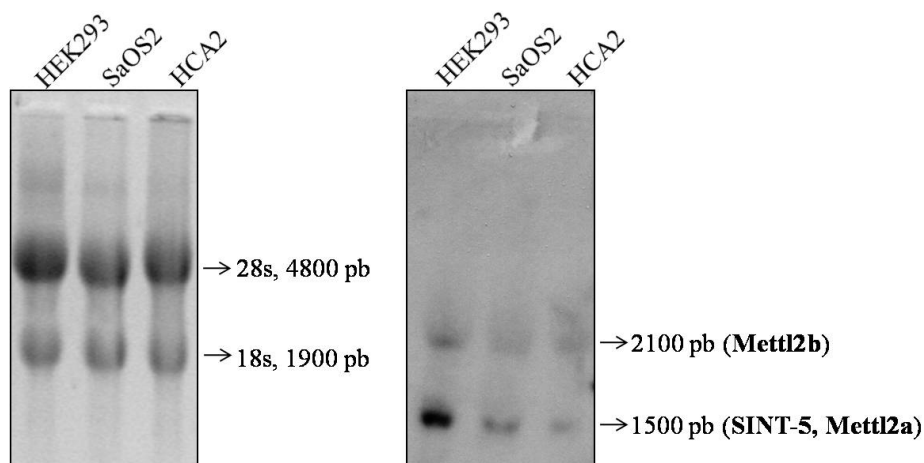


Figura 20.-La hibridación con la sonda diseñada en la región común de SINT-5 (Mettl2a) y Mettl2b da lugar a la detección de dos transcritos de diferente tamaño de peso equivalente a Mettl2a y Mettl2b. Se extrajo ARNm de las líneas celulares HEK293, SaOS2 y HCA2, se sometió a electroforesis y transferencia por capilaridad a una membrana de nylon. Esta membrana se hibridó con una sonda marcada con ^{32}P obtenida por digestión enzimática del ADNc de SINT-5 y se expuso con una película de autorradiografía (panel derecho). El tamaño de las bandas presentes en la película se estimó por comparación con el tamaño de las bandas del ARN 28s y 18s visualizados al teñir con bromuro de etidio el gel de agarosa tras la electroforesis en un transiluminador con luz ultravioleta (panel izquierdo).

2.2.3 Caracterización de la interacción entre SOK1 y SINT-5 en células de mamífero.

El ADNc de SINT-5 lo obtuvimos clonado en el vector pDNR de la compañía I.M.A.G.E., que comercializa ADNc de diferentes genes. Una vez dispusimos de este ADNc, lo amplificamos y lo clonamos en un vector de expresión en células de mamífero, concretamente en el vector pCMV5. Lo clonamos insertándolo a continuación del epitopo HA (fragmento de la proteína hemaglutinina) y así poder detectar su expresión mediante *western blot* utilizando un anticuerpo contra este epitopo. Una vez que estuvo clonado en este vector, verificamos su expresión transfectándolo en la línea celular de riñón de mono verde africano Cos7. Sometimos extractos proteicos de estas células transfectadas a análisis mediante *western blot* utilizando un anticuerpo contra el epitopo HA y comprobamos que SINT-5 se expresa como era de esperar con un peso de aproximadamente 28 KDa (**figura 21a**).

Una vez verificada la expresión de SINT-5, quisimos comprobar su interacción con SOK1 en células de mamíferos. Para esto, cotransfectamos células Cos7 con SOK1 unida al epitopo M2 y SINT-5 unido al epitopo HA. El hecho de que ambas proteínas se encuentren unidas a diferentes epitopos nos permite verificar su posible interacción mediante ensayos de coinmunoprecipitación. Para esto inmunoprecipitamos los extractos proteicos de las células cotransfectadas con SOK1 y SINT-5 con un anticuerpo dirigido contra uno de los dos epitopos y a continuación realizamos el análisis mediante *western blot* de los complejos inmunoprecipitados utilizando el otro anticuerpo. De esta manera pudimos comprobar que SOK1 y SINT5 interaccionan en células de mamífero (**figura 21b**).

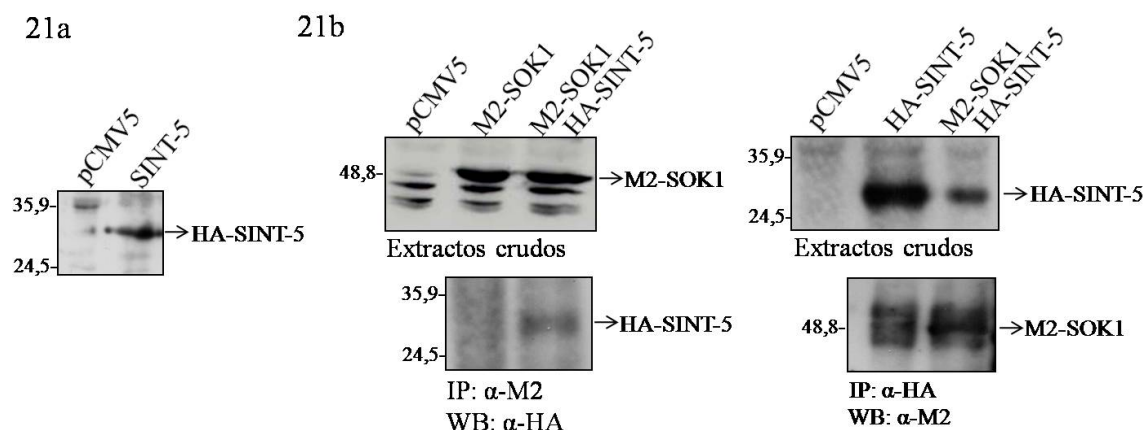
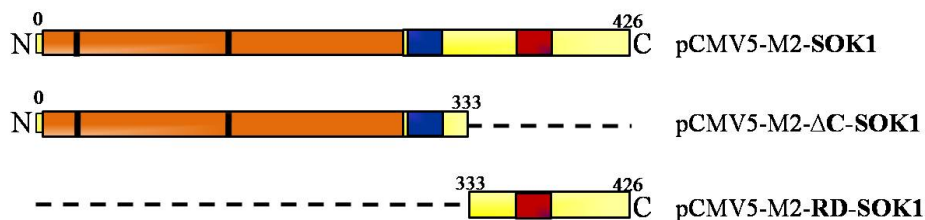


Figura 21.-SINT-5 se expresa en células de mamífero clonado en el vector pCMV5 e interacciona con SOK1. 21a.-SINT-5 se expresa en células Cos7 clonado en el vector pCMV5 (pCMV5-HA-SINT-5). Las células se transfectaron con el plásmido de expresión de SINT-5 y su expresión se determinó mediante *western blot* con un anticuerpo dirigido contra el epitopo HA. La banda correspondiente a HA-SINT-5 tiene el peso esperado de aproximadamente 25KDa. 21b.-SINT-5 interacciona con SOK1 cuando ambas se sobreexpresan en la línea celular Cos7. Las células Cos7 se transfectaron con los plásmidos de expresión de SOK1 y SINT-5 por separado o en conjunto. La expresión de ambos plásmidos se verificó mediante *western blot* con los anticuerpos dirigidos contra los epitopos M2 y HA (panel superior). Paralelamente en estos extractos proteicos se inmunoprecipitó a SOK1 utilizando el anticuerpo M2 y se analizó la presencia de SINT-5 en los complejos inmunoprecipitados mediante *western blot* con el anticuerpo dirigido contra el epitopo HA tras la electroforesis en gel de poliacrilamida de estos complejos (panel inferior izquierdo). Simultáneamente se inmunoprecipitó a SINT-5 en estos extractos proteicos utilizando el anticuerpo dirigido contra el epitopo HA y se determinó la presencia de SOK1 en los complejos inmunoprecipitados mediante *western blot* utilizando el anticuerpo contra el epitopo M2 (panel inferior derecho).

En SOK1 existen estructuralmente dos dominios diferenciados al igual que en el resto de las proteínas Ste20. Según la última clasificación de las kinasas Ste20, SOK1 se engloba en la familia GCK (Dan et al, 2001) y como todos los miembros de esta familia posee un dominio catalítico localizado en su extremo N-terminal y un dominio regulador localizado en el extremo C-terminal. Por este motivo, quisimos determinar con cuál de los dos dominios de SOK1 tiene lugar la interacción de SINT-5. Para esto cotransfectamos SINT-5 con dos constructos de SOK1 donde ambos dominios están clonados por separado en el vector de expresión p-CMV5 para poder sobreexpresarlos de manera independiente. Estos constructos son pCMV5-M2-ΔC-SOK1, que codifica los 333 aminoácidos del extremo N-terminal de SOK1 y pCMV5-M2-RD-SOK1, que codifica los 93 aminoácidos más próximos al extremo C-terminal (**figura 22a**). La coimmunoprecipitación de los extractos proteicos de las células cotransfectadas con

SINT-5 y ambos dominios de SOK1 por separado y posterior western blot nos permiten concluir que SINT-5 interacciona con el dominio catalítico de SOK1 (**figura 22b**).

22a



22b

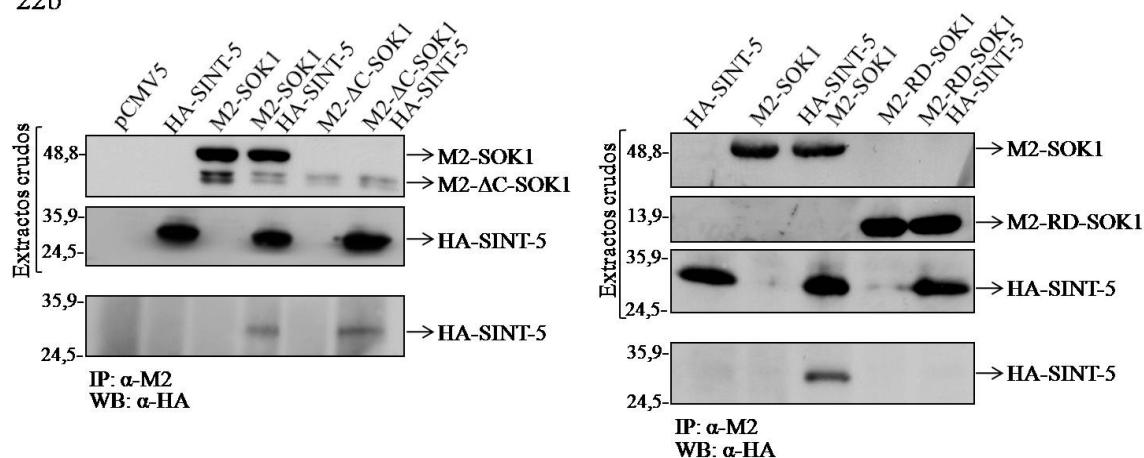


Figura 22.-SINT-5 interacciona con el dominio catalítico de SOK1 (ΔC-SOK1). 22a.- Representación esquemática de los constructos originados a partir de SOK1 para poder expresar por separado su dominio catalítico (ΔC-SOK1) y su dominio regulador (RD-SOK1). 22b.-SINT-5 interacciona con el dominio catalítico de SOK1. Se transfectaron células Cos7 con los plásmidos de expresión de SOK1, ΔC-SOK1 y RD-SOK1 por separado, o combinados con el plásmido de expresión de SINT-5. La expresión de todos los constructos se determinó mediante *western blot* (paneles superior y centrales). En los extractos proteicos se inmunoprecipitó a SOK1 y se estudió la presencia de SINT-5 en los complejos inmunoprecipitados mediante *western blot* utilizando el anticuerpo dirigido contra el epítipo HA (paneles inferiores).

2.2.4 SINT-5 disminuye la actividad quinasa de SOK1 y afecta a su movilidad en geles de poliacrilamida.

Una vez que determinamos que SOK1 y SINT-5 interaccionan en células de mamífero quisimos estudiar si aspectos como la regulación/activación de SOK1 podrían ser modificados por SINT-5. Por tratarse SOK1 de una quinasa, el primer aspecto que

quisimos determinar fue si SINT-5 afecta de alguna manera a esta actividad. Para esto cotransfectamos células Cos7 con SOK1 y SINT-5 y sometimos a las células a tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para estudiar tanto la actividad quinasa basal de SOK1 como la estimulada. Los extractos proteicos una vez inmunoprecipitados se incubaron con ^{32}P -ATP y MBP. Los resultados indican que SINT-5 reduce casi en un 50% tanto la actividad kinasa basal como la actividad kinasa estimulada con peróxido de hidrógeno de SOK1 (**figura 23**, panel izquierdo). En el panel derecho se muestra la cuantificación de la fosforilación realizada en un contador de partículas β . Para asegurarnos de que las diferencias observadas no pudieran deberse a diferencias en los niveles de expresión de ésta, estudiamos estos niveles mediante *western blot* (panel izquierdo inferior).

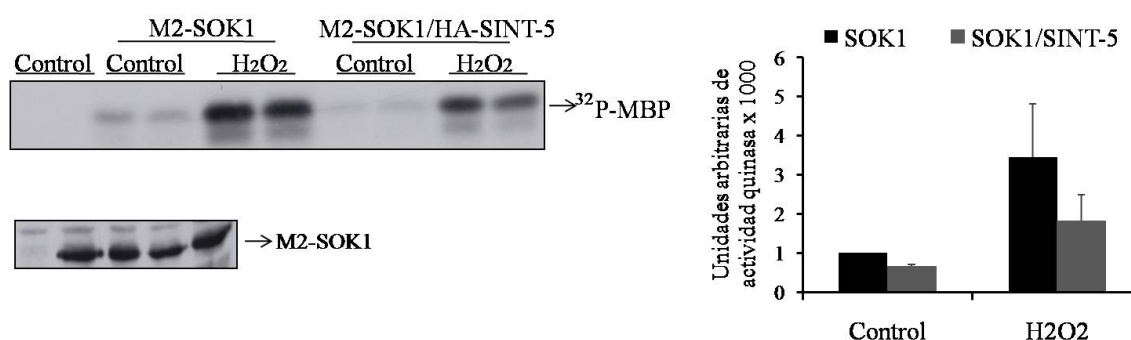
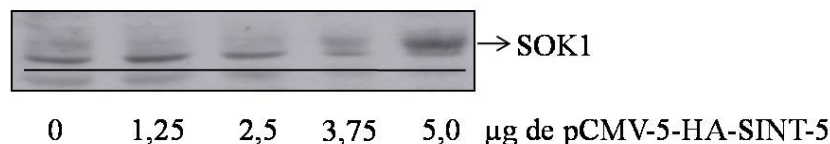


Figura 23.-SINT-5 reduce la actividad quinasa basal y estimulada con H_2O_2 de SOK1. Se transfectaron células Cos7 solamente con el plásmido de expresión de SOK1 o en conjunto con el plásmido de expresión de SINT-5. Las células se dividieron en dos grupos, uno se dejó sin tratar (Control) y el otro se sometió a tratamiento con H_2O_2 500 μM durante 40 minutos. En los extractos proteicos realizados con estas células se inmunoprecipitó a SOK1 con el anticuerpo dirigido contra el epítipo M2 y se determinó su actividad quinasa utilizando como sustrato exógeno MBP (panel superior izquierda). Los niveles de expresión de SOK1 se determinaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo dirigido contra el epítipo M2 (panel inferior izquierdo). La actividad del ^{32}P presente en las bandas de la MBP se cuantificó utilizando un contador de emisión de partículas β (panel derecho).

Además de los efectos de SINT-5 sobre la actividad quinasa de SOK1 nos propusimos estudiar si podría tener otros efectos sobre la quinasa, como por ejemplo, regular sus niveles en las células. Para esto transfectamos células HEK293 con cantidades crecientes de SINT-5 y sometimos los extractos proteicos de estas células a electroforesis y western blot utilizando un anticuerpo contra SOK1. Como resultado de

este experimento nos encontramos con que la sobreexpresión de SINT-5 provoca una modificación en SOK1 que conlleva un retardo en su migración en geles de poliacrilamida. Este retardo aumenta a medida que aumenta la cantidad de SINT-5 transfectada (**figura 24a**). Teniendo en cuenta que esta modificación puede ser compatible con una metilación de SOK1, para seguir avanzado en este aspecto, realizamos mediante mutagénesis dirigida un cambio en dos aminoácidos de SINT-5 presentes en la secuencia de las secuencias consenso de las metiltransferasas que se describen en un trabajo del año 1994. Concretamente realizamos las mutaciones en aminoácidos de la secuencia común a las metiltransferasas que utilizan como cofactor S-Adenosilmetionina. Esta secuencia, presente en metiltransferasas tanto de ADN, como de ARN, como de proteínas, está constituida por 9 aminoácidos que en SINT-5 se localizan entre el aminoácido de la posición 49 y el de la posición 57. Los residuos más conservados de esta secuencia son las glicinas que ocupan el lugar 5 y 7. Nosotros mutamos estos residuos de glicina a arginina. A la forma mutada la denominamos SINT-5^{RVR} (**figura 24b**). A continuación comprobamos si la sobreexpresión de este mutante tiene los mismos efectos sobre la migración de SOK1 en geles de poliacrilamida que SINT-5. Tras transfectar ambos mutantes por separado y someter los extractos proteicos de las células transfectadas a *western blot*, comprobamos que el mutante SINT-5^{RVR} no provoca cambios en la movilidad de SOK1 en geles de poliacrilamida (**figura 24c**). Este resultado apoya la hipótesis de que el retardo observado en la migración de ésta puede deberse a una metilación.

24a



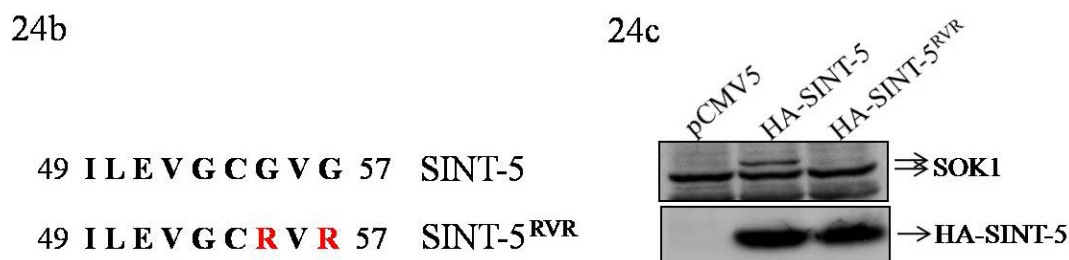


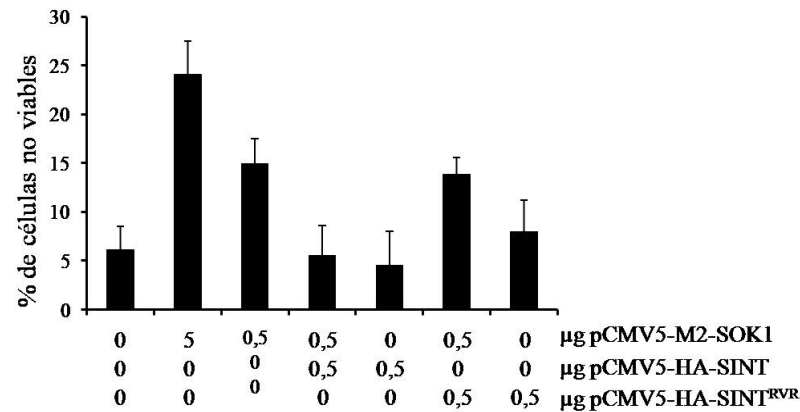
Figura 24.-La sobreexpresión de SINT-5 provoca un retardo en la migración de SOK1 en geles de poliacrilamida que es dependiente del dominio metiltransferasa. 24a.-La migración de SOK1 endógena sufre un retardo en geles de poliacrilamida dependiente de la cantidad de SINT-5 transfectada en células HEK293. Las células se transfectaron con 5 μ g de una combinación de los plásmidos pCMV5/pCMV5-HA-SINT-5 aumentado la cantidad de éste último según se indica en la figura. Transcurridas 24 horas tras la transfección se realizaron extractos proteicos, se sometieron a electroforesis y se visualizó a SOK1 utilizando un anticuerpo que hibrida con la proteína endógena. **24b.-**Mutaciones realizadas en SINT-5 sobre la secuencia consenso de las metiltransferasas que utilizan como cofactor S-Adenosilmetionina. **24c.-**El retardo en la migración de SOK1 depende del hipotético dominio metiltransferasa de SINT-5. Células HEK293 se transfectaron con el plásmido de expresión de SINT-5 y de SINT-5^{RVR} y la migración de SOK1 se valoró en extractos realizados 24 horas después de la transfección mediante *western blot*.

2.2.5 Efecto de SINT-5 y SINT-5^{RVR} sobre la muerte celular inducida por SOK1.

Teniendo en cuenta que nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de SOK1 induce muerte celular, nos propusimos estudiar si SINT-5 y el mutante SINT-5^{RVR} tienen algún efecto sobre este efecto de la quinasa. Para esto transfectamos células HEK 293 con los plásmidos de expresión de SOK1, SINT-5 y SINT-5^{RVR}, tanto por separado como combinando la transfección de SOK1 con SINT-5 y con SINT-5^{RVR}. Transcurridas 48 horas después de la transfección, estudiamos la viabilidad de las células mediante exclusión de azul de tripano (**figura 25a**). Tal como ya habíamos comprobado, la sobreexpresión de SOK1 induce muerte de manera proporcional a la cantidad de plásmido con que se transfectan las células. Comprobamos que esta muerte se ve reducida cuando SINT-5 se transfecta con SOK1. Esto no sucede cuando se combina la transfección de SOK1 con SINT-5^{RVR}. Comprobamos también que ni SINT-5 ni SINT-5^{RVR} tienen efecto sobre la viabilidad celular cuando se expresan por separado. Paralelamente, para verificar los resultados mediante otra técnica, realizamos extractos proteicos de las células transfectadas y estudiamos mediante *western blot* la liberación de citocromo c al citoplasma de la célula (**figura 25b**). En ambos casos, los

resultado2 indican que la coexpresión de SINT-5 con SOK1 inhibe la muerte celular que ésta provoca. Esta inhibición depende del hipotético dominio metiltransferasa, ya que no se produce cuando SOK1 se coexpresa con el mutante SINT-5^{RVR}

25a



25b

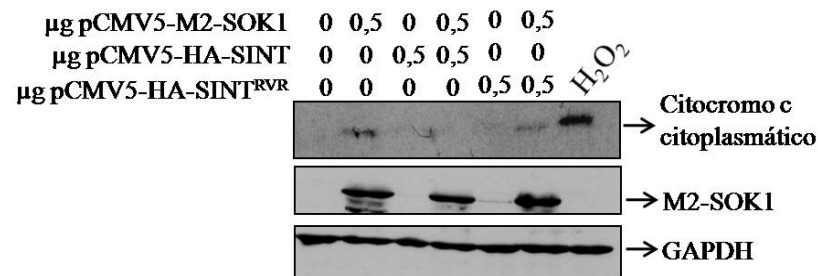


Figura 25.-A diferencia de SINT-5RVR, SINT-5, inhibe la muerte inducida por SOK1. 25a.-La cotransfección de SINT-5 con SOK1 en células HEK 293 inhibe la muerte celular que induce SOK1. Esta inhibición, no la produce SINT-5^{RVR}. Células HEK293 se transfectaron con las cantidades de plásmido de expresión de SOK1, SINT-5 y SINT-5^{RVR} indicadas en la gráfica. En todos los casos la cantidad de plásmido se igualó hasta 5 µg con el vector vacío (pCMV5). Transcurridas 48 horas después de la transfección se determinó la viabilidad celular mediante exclusión de azul de tripano. **25b.-**La coexpresión de SINT-5 con SOK1 inhibe la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma que ésta provoca. Este efecto no se observa con SINT-5^{RVR}. Células HEK293 se transfectaron con las cantidades indicadas en la figura de los plásmidos de expresión de SOK1, SINT-5 y SINT-5^{RVR}. Se utilizó tratamiento con H₂O₂ 500 µM durante 6 horas como control positivo. Tras la realización de extractos proteicos, la cantidad de citocromo c citoplasmática se determinó mediante *western blot*.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICOS (MUTANTES K49R, T174A Y 4A) DE SOK1 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Los efectos en la célula de las proteínas dependen en gran medida de su estructura y actividad, que a su vez están marcadas o determinadas por sus dominios y secuencias específicas. Estos dominios los constituyen residuos aminoácidos clave que controlan aspectos como la capacidad de fosforilación de las proteínas, la formación de estructuras secundarias, que intervienen en procesos como la interacción con otras proteínas de la célula, o la regulación de la actividad de la propia proteína, siendo en último caso fundamentales para que la proteína en cuestión pueda llevar a cabo sus funciones.

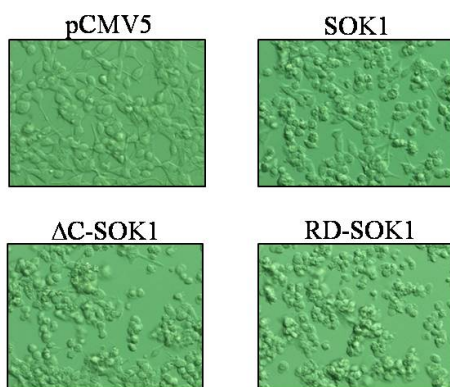
Nos propusimos estudiar la relación existente entre los principales dominios existentes en SOK1 y su capacidad para inducir muerte celular. Para esto utilizamos diferentes constructos que expresan o bien la forma entera de la proteína (SOK1), solamente el dominio catalítico (Δ C-SOK1) o solamente el dominio regulador (RD-SOK1) (**figura 22a**). Tanto sobre la proteína completa como sobre el dominio catalítico creamos otras mutaciones que nos permitan evaluar la implicación de dos residuos aminiácidos fundamentales para la actividad kinasa de la proteína, el residuo de lisina (K) de la posición 49, y el residuo de treonina (T) de la posición 174 sobre la muerte celular. Además creamos un mutante variando cuatro aminoácidos de la región de SOK1 homóloga a la secuencia de localización nuclear de Mst3 para valorar la funcionalidad de este dominio en SOK1.

3.1 Caracterización de los efectos de los dominios estructurales de SOK1 (RD y Δ C) sobre la viabilidad celular.

Como ya se ha mencionado anteriormente, (**figura 22a**) en SOK1, al igual que en el resto de las proteínas Ste20 existen dos dominios estructurales, el dominio catalítico y el dominio regulador, que se separan tras el procesamiento de la proteína por parte de las caspasas. Teniendo en cuenta este dato, nos propusimos estudiar la influencia de los dos dominios sobre la viabilidad celular. Para esto los sobreexpresamos por separado en la línea HEK293. Simplemente la observación de la

morfología de las células en el microscopio 48 horas después de la transfección, nos indicaba que además de SOK1, tanto la sobreexpresión de Δ C-SOK1 como de RD-SOK1 parecía influir en la viabilidad de las células (**figura 26a**). Para verificar esta hipótesis estudiamos la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano y llegamos a la conclusión de que los dos dominios que forman parte de la estructura básica de SOK1 (el dominio regulador C-terminal y el dominio catalítico N-terminal) inducen muerte celular (**figura 26b**).

26a



26b

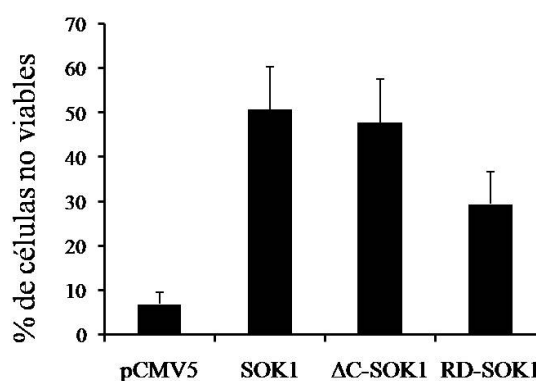


Figura 26.-Los dos dominios estructurales de SOK1 (Δ C-SOK1 y RD-SOK1) inducen muerte celular cuando se sobreexpresan en células HEK293. 26a.-La sobreexpresión de SOK1, Δ C-SOK1 y RD-SOK1 provoca que las HEK293 se redondeen y se despeguen de la placa de cultivo. Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de expresión de SOK1, Δ C-SOK1 y RD-SOK1. Transcurridas 72 horas después de la transfección estas células se observaron y fotografiaron en un microscopio Hoffman de campo claro. 26b.-Los dos dominios estructurales de SOK1 provocan muerte celular cuando se sobreexpresan en células HEK293. Transcurridas 72 horas después de la transfección de células HEK293 con SOK1, Δ C-SOK1 y RD-SOK1 se estudió la viabilidad de estas células mediante exclusión de azul de tripano.

3.2. Caracterización de la influencia de la actividad quinasa de SOK1 y su hipotética señal de localización nuclear sobre la viabilidad celular.

Con respecto a los dominios bioquímicos de SOK1, nos propusimos estudiar la relación entre la actividad quinasa y necesidad de la integridad de la secuencia homóloga a la NLS de Mst3 tanto de SOK1 como de Δ C-SOK1, con su capacidad para producir muerte.

Para estudiar el efecto de la actividad quinasa de SOK1 realizamos diferentes mutantes tanto sobre la proteína entera (SOK1), como sobre el dominio catalítico (Δ C-SOK1). Para eliminar la actividad quinasa de SOK1 mutamos la lisina (K) de la posición 49 a la que se une el ATP del que la kinasa obtiene un grupo fosfato para fosforilar a sus posibles sustratos, cambiándola por una arginina (R). Construimos así los mutantes sin actividad quinasa SOK1^{K49R} y Δ C-SOK1^{K49R} (**figura 27**). También en relación con la actividad quinasa de SOK1 decidimos mutar la treonina (T) de la posición 174 a alanina (A) generando los mutantes SOK1^{T174A} y Δ C-SOK1^{T174A} (**figura 27**). Esta treonina se localiza en el bucle de activación de SOK1 y la fosforilación de este residuo aminoacídico es fundamental para posibilitar el acceso al sustrato.

Con respecto a la putativa señal de localización nuclear (NLS), para estudiar la relación de esta señal con la capacidad de inducir muerte celular utilizamos los mutantes SOK1^{4A} y Δ C-SOK1^{4A}. Para la construcción de estos mutantes se cambiaron cuatro aminoácidos, concretamente las lisinas (K) de las posiciones 275, 276 y 288, y la arginina (R) de la posición 289 por alaninas (A) (**figura 27**). Estos mutantes se diseñaron basándonos en la similitud de secuencia en esta región entre SOK1 y Mst1, Mst2 y Mst3. SOK1 comparte una elevada homología entre los aminoácidos 275 y 291 (KKTSFLTELIDRY**K**RWK) con la región que ha sido caracterizada como la señal de localización nuclear de Mst3 comprendida entre sus aminoácidos 279 y 296 (KKTSYLTELIDRY**K**RWK), (Lee et al, 2004).

Nuestro grupo de investigación demostró que esta señal es funcional en SOK1. La construcción del mutante SOK1^{4A} fusionado a la proteína verde fluorescente GFP confirmó que SOK1 al igual que Mst1, Mst2 y Mst3 posee una señal de localización nuclear. Se observó que este mutante no se localiza en el núcleo de la célula a diferencia de la proteína sin mutar en respuesta a anoxia química (comunicación personal de Miguel Fidalgo). Teniendo en cuenta funcionalidad de esta señal, nos pareció interesante estudiar su relación con la capacidad de inducir muerte celular por parte de SOK1 así como por parte de Δ C-SOK1.

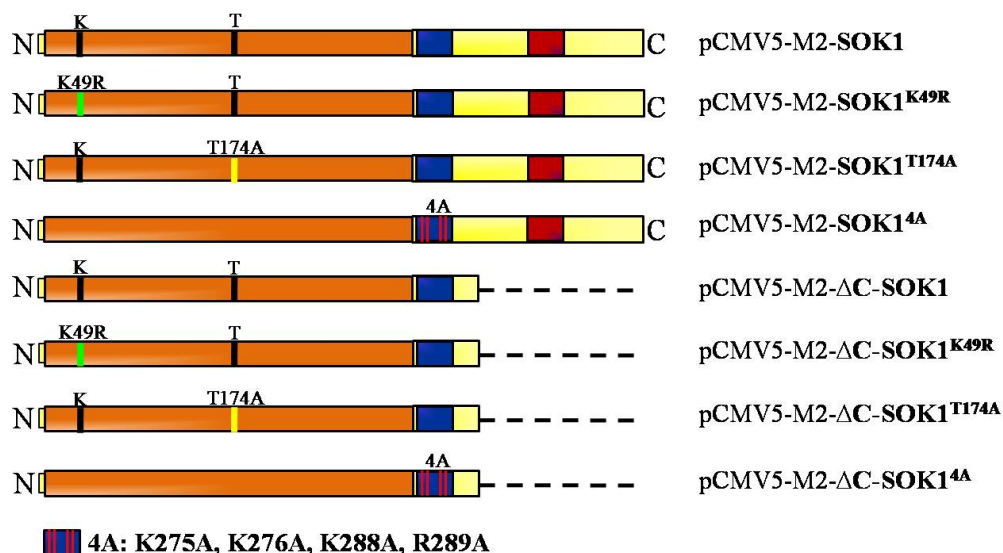


Figura 27.-Representación esquemática de los mutantes originados a partir de SOK1 y ΔC-SOK1 mediante mutagénesis dirigida.

3.2.1 Efecto de los mutantes K49R, T174A y 4A sobre la muerte inducida por SOK1.

Para estudiar la relación existente entre la actividad quinasa de SOK1 y su capacidad para localizarse en el núcleo de la célula con la inducción de muerte celular, transfectamos en células HEK293 los mutantes SOK1^{K49R}, SOK1^{T174A} y SOK1^{4A} unidos al epitopo M2 clonados en el vector de expresión pCMV5 (**figura 27**). Transcurridas 72 horas después de la transfección estudiamos la viabilidad de estas células mediante exclusión de azul de tripano (**figura 28c**). Para verificar que las diferencias obtenidas en los porcentajes de la muerte celular no pudieran deberse a diferencias en los niveles de expresión de los diferentes mutantes, determinamos estos niveles sometiendo extractos proteicos de estas células a *western blot* utilizando un anticuerpo contra el epitopo M2. Comprobamos que la cantidad de proteína expresada es similar para todos los mutantes (**figura 28a**). Una vez que verificamos que no hay diferencias en los niveles de expresión que pudieran ser las causantes de las diferencias observadas en muerte, inmunoprecipitamos una alícuota de los extractos proteicos obtenidos de la transfección de cada mutante para estudiar su actividad quinasa sobre el sustrato MBP (**figura 28b**).

Al evaluar los niveles de muerte, nos encontramos con que los dos mutantes sin actividad quinasa ($\text{SOK1}^{\text{K49R}}$ y $\text{SOK1}^{\text{T174A}}$) pueden inducir muerte aunque de manera menos eficiente que SOK1. Esto nos indica que con los niveles de expresión de este experimento, la actividad quinasa de SOK1 no es completamente necesaria para que pueda inducir muerte celular. Por el contrario, la capacidad de inducir muerte por parte del mutante SOK1^{4A} se ve reducida. Este resultado nos indica que más que su actividad quinasa, para que SOK1 pueda inducir muerte celular es importante que pueda entrar en el núcleo de la célula (**figura 28c**).

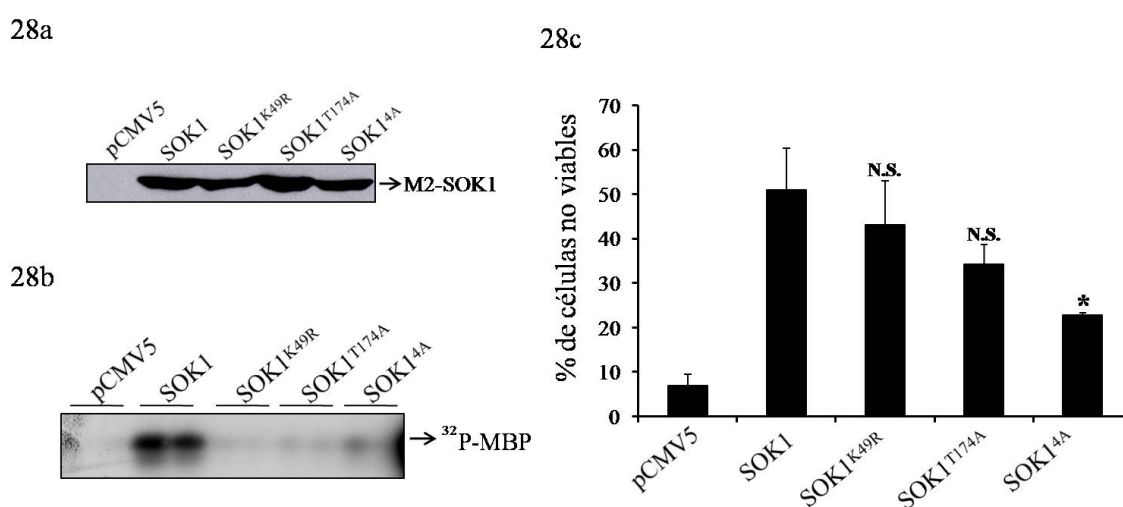


Figura 28.-Relación entre los mutantes de SOK1 K49R, T174A y 4A y su capacidad para inducir muerte celular. **28a.-**SOK1 y los diferentes mutantes $\text{SOK1}^{\text{K49R}}$, $\text{SOK1}^{\text{T174A}}$, SOK1^{4A} se transfectaron en células HEK293. Sus niveles de expresión se evaluaron en extractos proteicos realizados 24 horas después de la transfección mediante *western blot* utilizando un anticuerpo contra el epítipo M2. **28b.-**La actividad quinasa de cada uno de los mutantes sobre el sustrato MBP se detectó inmunoprecipitando los extractos proteicos con un anticuerpo dirigido contra el epítipo M2. **28c.-**La inducción de muerte de cada uno de los mutantes se determinó mediante exclusión de azul de tripano 72 horas después de la transfección de las células HEK293. N.S. (diferencias no significativas) con respecto a SOK1. * $p < 0.05$ para SOK1^{4A} con respecto a SOK1.

3.2.2 Efecto de los mutantes K49R, T174A y 4A sobre la muerte inducida por $\Delta\text{C-SOK1}$.

Teniendo en cuenta que SOK1 se corta tanto *in vitro*, como *in vivo* tras tratamiento con anoxia química por las caspasas (comunicación de Miguel Fidalgo), y

que la sobreexpresión del dominio catalítico de SOK1 (Δ C-SOK1) induce muerte celular (**figura 26**), nos propusimos estudiar la relación existente entre la actividad quinasa de este dominio y su capacidad para localizarse en el núcleo de la célula con su capacidad para inducir muerte. Para esto transfectamos los mutantes originados a partir de Δ C-SOK1, Δ CSOK1^{K49R}, Δ C-SOK1^{T174A} y Δ C-SOK1^{4A} (**figura 27**) en células HEK 293 y estudiamos su viabilidad celular 72 horas después de la transfección mediante exclusión de azul de tripano (**figura 29c**). Evaluamos los niveles de expresión de los diferentes mutantes mediante *western blot* y nos encontramos con que los niveles son similares para todos los mutantes originados a partir de Δ C-SOK1 (**figura 29a**), pero menores si los comparamos con los niveles de expresión de SOK1 y sus mutantes (**comparación figuras 28a/29a**). A pesar de que los niveles de expresión son menores, Δ C-SOK1 posee una actividad quinasa muy elevada. Tal como era de esperar, ni Δ C-SOK1^{K49R} ni Δ C-SOK1^{T174A} poseen actividad quinasa. En el caso de Δ C-SOK1^{4A}, su actividad quinasa es menor que la de Δ C-SOK1, pero si la comparamos con la actividad de SOK1, es incluso mayor que la de ésta (**figura 29b, comparación figuras 28b/29b**).

Con respecto a la capacidad de inducir muerte, Δ C-SOK1 lo hace en niveles equiparables a SOK1. El porcentaje de células no viables se reduce de forma estadísticamente significativa en el caso de Δ C-SOK1^{K49R} y Δ CSOK1^{T174A}. Esto nos indica, que en el contexto de sobreexpresión de Δ C-SOK1, la actividad quinasa sí que es importante para la inducción de muerte celular. En el caso de Δ C-SOK1^{4A}, el porcentaje de muerte que puede inducir es también significativamente menor a pesar de que su actividad quinasa es incluso mayor que la de SOK1 (**figura 29c**).

Todos estos resultados obtenidos con los mutantes que hemos originado a partir de SOK1 nos indican que la actividad quinasa es no imprescindible para inducir muerte celular en el contexto en el que sobreexpresa la proteína completa, pero sí lo es cuando lo que sobreexpresamos es solamente el dominio catalítico de ésta. Con respecto a la señal comprendida entre los aminoácidos 275 y 291, que regula la capacidad de SOK1 para localizarse en el núcleo de la célula, es importante para la inducción de muerte celular tanto en el contexto de sobreexpresión de la proteína completa como en el contexto de sobreexpresión del dominio regulador (**figuras 28 y 29**).

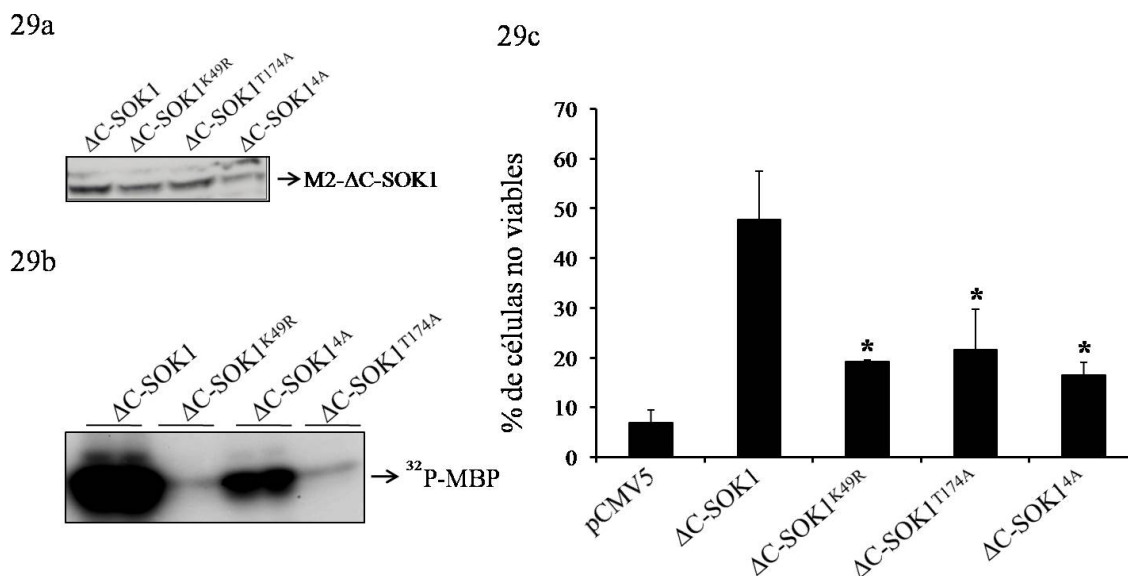


Figura 29.-Relación entre los mutantes originados a partir de $\Delta C-SOK1$, $\Delta C-SOK1^{K49R}$, $\Delta C-SOK1^{T174A}$ y $\Delta C-SOK1^{4A}$ y su capacidad para inducir muerte celular. 29a.- $\Delta C-SOK1$ y los diferentes mutantes $\Delta C-SOK1^{K49R}$, $\Delta C-SOK1^{T174A}$, $\Delta C-SOK1^{4A}$ se transfectaron en células HEK293. Sus niveles de expresión se evaluaron en extractos proteicos realizados 24 horas después de la transfección mediante *western blot* utilizando un anticuerpo contra el epitopo M2. 29b.-La actividad quinasa de cada uno de los mutantes sobre el sustrato MBP se detectó inmunoprecipitando los extractos proteicos con un anticuerpo dirigido contra el epitopo M2. 29c.-La inducción de muerte de cada uno de los mutantes se determinó mediante exclusión de azul de tripano 72 horas después de la transfección de las células HEK293. * $p < 0.05$ con respecto a $\Delta C-SOK1$.

DISCUSIÓN

En los últimos años, el grupo de las proteínas Ste20 en general, y de las quinasas Mst en particular, ha sido objeto de numerosos estudios. El auge en el estudio de estas proteínas, ha tenido lugar sobre todo desde el descubrimiento que la proteína homóloga a este grupo de quinasas en levaduras, Ste20p, actúa como una MAP4K (Wu et al, 1995). Algunas de las Ste20 de mamíferos conservan esta función, y su caracterización funcional ha ayudado a conocer con mayor detalle la regulación de las rutas de las MAPK.

SOK1 no activa ninguna de las rutas hasta ahora descritas de las MAPK (Pombo et al, 1996). Fue la primera Ste20 que se demostró que se activaba en respuesta a estrés celular específico, concretamente en respuesta a estrés oxidativo (Pombo et al, 1997). Estas condiciones tan estrictas de activación, hicieron pensar que podría formar parte de una nueva ruta que regulara la respuesta celular a este tipo de estrés. Siempre teniendo en cuenta estas condiciones de activación, se decidió estudiar a SOK1 para tratar de esclarecer su función celular así como sus mecanismos de regulación, con la finalidad de avanzar en el conocimiento de los procesos fisiopatológicos en los que el estrés oxidativo está implicado.

Los resultados de este trabajo de investigación demuestran que SOK1 está implicada o participa en la regulación de procesos relacionados con la viabilidad celular. Tal como se demuestra también en este trabajo, en este aspecto influye la interacción con la hipotética metiltransferasa SINT-5, inhibiendo la muerte que SOK1 induce. No debemos olvidarnos de que para SOK1 se ha descrito también la participación en otras funciones de la célula. Concretamente en el mantenimiento de la estructura del aparato de Golgi y la migración celular, funciones en las que están implicadas las proteínas GM130 o 14-3-3 ζ (Preisinger et al, 2004). El hecho de que SOK1 pueda participar en la regulación de diferentes aspectos de la biología celular no es novedoso si la comparamos con otras proteínas del grupo de las Ste20. Es éste un grupo de proteínas muy heterogéneo funcionalmente, y para algunas de ellas se ha demostrado su implicación en diferentes aspectos de la biología celular (Dan et al, 2001; Pombo et al, 2006).

Fueron precisamente las condiciones de activación de SOK1, estrés oxidativo extremo, acompañado de un aumento de los niveles del calcio celular (Pombo et al, 1996), lo que hizo pensar que podría tener un papel en la regulación de la viabilidad

celular. En este sentido, en este trabajo demostramos que es así. Su sobreexpresión en diferentes líneas celulares demuestra que SOK1 provoca muerte celular en todas las líneas que se han estudiado. Demostramos además que la cantidad de muerte aumenta de forma directamente proporcional al tiempo transcurrido desde la transfección así como de la cantidad de SOK1 sobreexpresada. Después de estudiar diferentes aspectos morfológicos y bioquímicos de las células que sobreexpresan SOK1, demostramos que la muerte inducida por SOK1 se parece más a la apoptosis que a la necrosis. Esto lo ponen de manifiesto hechos como la formación de yemas en la membrana de las células, la condensación de la cromatina, la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma, la necesidad de la actividad de las caspasas para que la muerte celular pueda producirse, y la inactivación por proteólisis de la proteína PARP.

Que la sobreexpresión de SOK1 induzca muerte celular, concretamente apoptosis, es consistente con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación con otras proteínas del grupo de las quinasas Mst, Mst1, Mst2 y Mst3 (Graves et al, 1998; Huang et al, 2002; Ura et al, 2001). Con respecto a Mst4, su implicación en procesos de muerte celular es un hecho que todavía está cuestionado, ya que existen diferencias al respecto en los diferentes trabajos que se han publicado hasta el momento (Dan et al, 2002; Lin et al, 2001; Sung et al, 2003).

SOK1 comparte con las proteínas del grupo de las quinasas Mst el hecho de que están implicadas en procesos relacionados con la muerte celular (como ya se ha dicho, aspecto cuestionado en el caso de Mst4). Esto es lógico, teniendo en cuenta que son proteínas que presentan una gran homología y que por lo tanto se encuentran muy próximas filogenéticamente. Aunque todas posean la capacidad de inducir muerte celular, seguramente las mayores diferencias con respecto a sus actividades y funciones biológicas, y esta es quizás la parte más desconocida para la mayoría de ellas, radique en los estímulos fisiológicos que provoquen su activación, así como la posible especificidad de tejido para este estímulo y esta activación. Será necesario realizar más estudios con todas ellas que ayudarán a esclarecer la posible redundancia o especificidad de estas proteínas. En este sentido, es necesario estudiar si su activación puede ser específica de determinados tejidos o de determinadas etapas del desarrollo. Sería interesante también, comparar la respuesta celular cuando se eliminan una, varias o todas las quinasas Mst. En relación con este aspecto, podemos citar un trabajo que se ha publicado recientemente (Wu et al, 2007) en el que se demuestra que la cantidad de

Mst3 está incrementada en trofoblastos de placenta tras el parto. Este aumento no se produce, o Mst3 no está presente en la placenta, tanto durante los tres primeros meses de gestación como en placentas de partos por cesárea. Por este motivo se relaciona el aumento de Mst3 con la apoptosis que sufren los trofoblastos en el momento en el que el parto se produce. Este trabajo apoya la teoría de que aunque la función de las quinasas Mst pueda ser redundante, pueden existir funciones específicas de cada tipo de tejido.

Sin embargo, existen otras proteínas con las que SOK1 no guarda homología, pero con las que comparte el hecho de ser activadas en procesos relacionados con el estrés oxidativo, que también participan en el control de la supervivencia celular.

Es el caso por ejemplo de Akt, que al igual que SOK1, es una serina/treonina quinasa que también se activa en respuesta a un incremento en la concentración de ROS en la célula. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en el caso de SOK1, tanto su activación como su sobreexpresión en diferentes líneas celulares, promueve la supervivencia celular, bien gracias a la inactivación de diferentes rutas proapoptóticas o bien por la activación de rutas de supervivencia (revisado por Mullonkal et al, 2007).

ASK1, aunque también puede ser activada en respuesta a otros estímulos como TNF α o el tratamiento con lipopolisacátidos, comparte con SOK1 el hecho de que se activa como consecuencia del incremento del estrés oxidativo. En el caso de ASK, un incremento de los niveles de calcio citoplasmáticos son suficientes para producir esta activación. En el caso de SOK1, este incremento es necesario pero no suficiente para que la proteína se active. Las consecuencias tanto de la activación como de la sobreexpresión de ASK son el aumento de la muerte celular por apoptosis (Hatai et al, 2000), al igual que sucede en el caso de SOK1. Sin embargo, una diferencia fundamental entre ambas es que ASK provoca la activación de las rutas de las MAPK p38 y JNK, y sin embargo los efectos de SOK1 no están mediados por estas rutas.

La implicación de SOK1 en procesos que regulan la viabilidad celular, y la demostración de que este es un efecto fisiológico de la quinasa y no una consecuencia inespecífica de su sobreexpresión, se verifica con el hecho de que células donde los niveles de SOK1 se reducen mediante shARN son más resistentes a la muerte celular. Estas células son más resistentes al tipo de estímulo que activa a SOK1, concretamente a anoxia química, un modelo llevado a cabo mediante tratamiento de las células de

cultivo con cianuro y 2-deoxiglucosa, que provoca la disminución de los niveles de ATP celulares y favorece la aparición de radicales libres. Teniendo en cuenta que la anoxia química es un modelo equivalente a la isquemia que pueden sufrir los tejidos de un determinado organismo cuando se ven privados de aporte sanguíneo, y que los niveles de SOK1 son importantes para la muerte inducida por anoxia química en cultivos celulares, puede hipotetizarse que SOK1 también juegue un papel en la muerte que sufren las células de órganos o tejidos que sufren isquemia o isquemia seguida de reperusión. En esta línea, el desarrollo de modelos animales donde estén aumentados o disminuídos los niveles de SOK1 podrá ayudar a esclarecer si realmente ésta está implicada en este tipo de patologías *in vivo*.

Además de la implicación de SOK1 en la muerte en respuesta a anoxia química, estímulo que provoca su activación a corto plazo (Pombo et al, 1997), demostramos la participación de SOK1 en la muerte celular en respuesta a estrés osmótico. Hasta ahora, los estudios que se habían hecho con respecto a la activación de SOK1 en respuesta a estrés osmótico habían sido realizados con tiempos de tratamiento cortos, y habían puesto de manifiesto que en estas condiciones SOK1 no se activa (Pombo et al, 1997). Si bien, en este trabajo demostramos que SOK1 sí que se activa en respuesta a este tipo de estrés pero tras tiempos medios/largos de tratamiento. Estos tratamientos de mayor duración permiten que se incrementen en la célula los niveles de ROS (Kultz, 2005). En este trabajo demostramos también que son estas ROS las responsables de la activación de SOK1, ya que ésta no se produce en presencia de antioxidantes. La demostración de que SOK1 puede activarse a tiempos cortos o a tiempos medios/largos dependiendo del tipo de estímulo, es algo que hasta el momento solo ha sido descrito para SOK1 entre las quinasas de su grupo. Es por lo tanto lógico que al igual que sucede en el caso de la anoxia química, la reducción de los niveles celulares de SOK1 haga que las células sean más resistentes frente al estrés osmótico.

En este sentido, se ha demostrado un efecto similar con otras quinasas Mst, concretamente con Mst1 y Mst3. En el caso de Mst1, está demostrado que la reducción de sus niveles aumenta la supervivencia de cultivos de neuronas frente a estrés oxidativo inducido con H₂O₂, y además, se ha comprobado que los niveles de su ortólogo en nematodos, CST-1, están directamente relacionados con el tiempo de vida de estos organismos (Lehtinen et al, 2006). El hecho de que sea un mecanismo tan conservado en la evolución, en el caso de Mst1, y probablemente también en el caso de

SOK1, indica también que es un mecanismo de gran relevancia biológica. En el caso de Mst1, estos efectos están mediados por el factor de transcripción FOXO3 (o su ortólogo en nematodos DAF-16), sin embargo serán necesarios más estudios para determinar que proteínas median los efectos observados en el caso de SOK1. Con respecto a Mst3, se ha demostrado una relación entre sus niveles de expresión en células de placenta humana y la cantidad de estrés oxidativo a la que se ven sometidas. Además, se ha demostrado que la inhibición de sus niveles mediante siARN así como la sobreexpresión de un mutante de la proteína sin actividad quinasa, aumenta la supervivencia de este tipo celular al tratamiento con H₂O₂ (Wu et al, 2007).

El hecho de que existan otras proteínas, ya sean quinasas Mst (Mst1, Mst3) o no (Akt, ASK), que se activan o regulan aspectos relacionados con la supervivencia celular en respuesta a estrés oxidativo, explica el hecho de que la inhibición de SOK1 no anule completamente la muerte en los modelos que en este trabajo hemos escogido para generar radicales libres y estrés oxidativo (anoxia química y estrés osmótico). En este sentido debemos considerar el hecho de que SOK1 no activa ninguna ruta de las MAPK conocidas, lo que contribuye a situarla en una nueva ruta implicada en la muerte por apoptosis en respuesta a estrés. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las rutas reguladas por todas estas proteínas son en principio rutas independientes, y además que en nuestro modelo la inhibición de SOK1 no es total, es lógico que la muerte en respuesta a estrés no se inhiba por completo.

Los estímulos que activan a SOK1, la anoxia química y el estrés oxidativo, se consideran generalmente como estímulos que inducen necrosis. Sin embargo, esto depende del modelo celular y sobre todo de la dosis, ya que si el estímulo no es suficientemente intenso produce apoptosis (Zong et al, 2006). En nuestro modelo, el tratamiento con anoxia química apenas produce liberación al medio de cultivo de LDH, una enzima intracelular que solamente se libera al medio si la célula se rompe por necrosis, y sí provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria. Esto significa que en nuestras condiciones experimentales la anoxia química induce apoptosis. Además, la inhibición de SOK1 inhibe la liberación de citocromo c pero no de la liberación de LDH. Por lo tanto, esto confirma que la inhibición de SOK1 protege frente a la apoptosis y no frente a la necrosis. Este hecho, junto con la capacidad de inducir apoptosis por parte de la proteína sobreexpresada, otorga funcionalmente a esta quinasa un papel en la muerte celular por apoptosis mediada por estrés extremo.

Durante el proceso de apoptosis, al igual que sucede con Mst1 (Graves et al, 1998; Lee et al, 1998), Mst2 (Deng et al, 2003) y Mst3 (Huang et al, 2002), que son cortadas por las caspasas, con nuestros resultados hemos demostrado que SOK1 también es cortada por estas enzimas. En el caso de Mst4 los datos acerca de su corte por parte de las caspasas son contradictorios (Dan et al, 2002; Huang et al, 2002; Lin et al, 2001).

Las caspasas son proteasas que cortan a sus sustratos en residuos de ácido aspártico. En la secuencia de SOK1 existen cinco residuos de ácido aspártico localizados entre los aminoácidos 303 y 347. Teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos de SOK1 generados durante la apoptosis, (comunicación de Miguel Fidalgo) y que esta región es muy similar a la región de corte de Mst3, pensamos que esta es la zona de corte más probable en toda la proteína. Sin embargo, tanto mutaciones individuales de estos residuos de ácido aspártico, como la mutación de varios residuos en conjunto, no previenen el corte de SOK1 por parte de la caspasa 3 por lo menos *in vitro*. Esto nos hace suponer que la caspasa 3 corta a SOK1 en algún lugar atípico.

Nuestros resultados demuestran que SOK1 es un sustrato de las caspasas y que la muerte inducida por su sobreexpresión es dependiente de la actividad de estas enzimas. Sin embargo también demuestran que la actividad de las caspasas no es necesaria para la activación de SOK1 en respuesta a anoxia química. Estos resultados sitúan a SOK1 tanto por debajo como por encima de la actividad de estas enzimas. El hecho de situarse por encima y por debajo de la actividad de las caspasas en la ruta de señalización no es algo atípico en el caso de quinasas que regulan procesos apoptóticos. Es por ejemplo el caso de Mst1 (Ura et al, 2001) o de SLK, una Ste20 implicada en procesos de muerte celular de la subfamilia GCK-V (Sabourin et al, 2000). En ambos casos, la quinasa desencadena el proceso de apoptosis provocando la activación de las caspasas. Una vez activadas, las caspasas cortan a la quinasa de manera que se hace más activa y crea bucle de retroalimentación positiva sobre la propia activación de las caspasas para amplificar la señal de muerte. Con respecto a SOK1, nuestros resultados demuestran que las caspasas se activan y están implicadas en la ruta de muerte que provoca cuando se sobreexpresa y que además la cortan *in vitro*. Aunque en principio su activación en respuesta a anoxia química (a corto plazo) es independiente de la actividad de estas proteasas. Además, datos de nuestro laboratorio, confirman que las caspasas cortan a SOK1 *in vivo* tras tiempos de tratamiento más largos dando lugar a un

fragmento de aproximadamente 35 KDa. Todos estos datos, apoyan la teoría de que en el caso de SOK1, podría darse una situación muy similar a la que ocurre por ejemplo en el caso de Mst1.

Todos estos datos que relacionan a SOK1 con muerte celular, parecen no concordar con los datos publicados por el grupo de Preisinger y colaboradores (Preisinger et al, 2004). En este trabajo demuestran que SOK1 se localiza en el aparato de Golgi, y que su presencia es importante para el mantenimiento de la estructura de este orgánulo. Además, demuestran la implicación de SOK1 en procesos de migración e invasión celular, un proceso que es dependiente de la proteína 14-3-3- ζ que identificaron como sustrato de SOK1. Datos obtenidos en nuestro grupo de investigación, confirman que SOK1 se localiza en el aparato de Golgi en células no sometidas a estrés, sin embargo, cuando se someten las células a anoxia química y por lo tanto SOK1 se activa, esta localización cambia, y aunque se distribuye por toda la célula, se observa una acumulación preferentemente nuclear (comunicación personal de Miguel Fidalgo). El hecho de que la forma de SOK1 que se encuentra en el núcleo de la célula se corresponda en tamaño con la forma obtenida tras el corte *in vitro* de SOK1 por parte de la caspasa 3 (aproximadamente 35 KDa), y que la entrada de SOK1 en el núcleo es dependiente de la actividad de las caspasas (comunicación personal de Miguel Fidalgo), significa que este corte también se produce *in vivo*. Por lo tanto, parece ser que SOK1 interviene en el mantenimiento de la estructura del aparato de Golgi en células no sometidas a estrés, y que cuando se someten a estrés se mueve al núcleo y ésta pasa a tener una función proapoptótica.

Después de haber demostrado que la sobreexpresión de SOK1 provoca muerte celular con características de apoptosis, nos propusimos determinar la implicación de la actividad quinasa de ésta en esta función. La sobreexpresión de los dos mutantes sin actividad quinasa originados a partir de SOK1 (SOK^{K49R} y SOK^{T174A}), aunque en menor medida que la proteína sin mutar, provoca igualmente la muerte de las células. Aunque se han descrito muchos casos en los que la pérdida de la actividad quinasa de una determinada proteína conlleva la pérdida de la capacidad para inducir muerte por parte de ésta, nuestros resultados indican que esto no es así en el caso de SOK1 cuando la proteína se sobreexpresa. Podemos pensar que la actividad quinasa de SOK1 es importante para regular otros aspectos de la biología celular en que los que puede estar implicada. En este sentido, sabemos por ejemplo, que la presencia de la treonina en la

posición 174 del bucle da activación de SOK1 juega un papel importante para el mantenimiento de la estructura del aparato de Golgi (Preisinger et al, 2004). También podemos pensar que al igual que se ha descrito con la sobreexpresión otras proteínas, la actividad quinasa no sea imprescindible a la hora de poder activar una determinada ruta de señalización, en este caso, una ruta que conduzca a la muerte de la célula. Esto se ha demostrado para dos quinasas clasificadas dentro de la subfamilia GCK-I del grupo de las Ste20, HPK1 y GCK. Para estas proteínas, la sobreexpresión de mutantes sin actividad quinasa, provoca al igual que la sobreexpresión de las formas catalíticamente activas la activación de la ruta de JNK (Diener et al, 1997; Yuasa et al, 1998). En este caso se hipotetiza que, o bien los mutantes sin actividad quinasa dimerizan con la forma endógena de la proteína, o que la activación de MEKK1 por parte de éstas no se produzca por fosforilación directa, sino que simplemente la interacción entre ambas proteínas sea suficiente para que MEKK1 se active. Según nuestros resultados, podemos pensar que con SOK1 sucede algo similar. Que su sobreexpresión, independientemente de su actividad quinasa, pueda provocar la activación de alguna ruta que conlleve la muerte de la célula, o bien por dimerización con la forma endógena de la proteína, o bien porque solamente su interacción con alguna otra quinasa sea suficiente para provocar la activación de ésta.

La teoría más plausible para explicar la capacidad de SOK1^{4A} para inducir o no muerte celular se basa en su localización. Las mutaciones de SOK1^{4A} se localizan en una zona homóloga a la señal de localización nuclear (NLS) de Mst3. Datos de nuestro laboratorio confirman que esta señal también es funcional en SOK1, de forma que el único mutante incapaz de localizarse en el núcleo de la célula incluso después de someter a las células a anoxia química es el mutante SOK1^{4A}. Esto nos puede hacer pensar que, independientemente de la actividad quinasa de la proteína, lo que limite su capacidad para inducir muerte sea la posibilidad de localizarse en el núcleo celular.

Existen otras explicaciones para justificar la incapacidad para inducir muerte por parte del mutante SOK1^{4A}. En este mutante están cambiados cuatro aminoácidos, a diferencia de los otros dos mutantes (SOK^{K49R} y SOK1^{T174A}), en los que sólo está alterado uno. El hecho de presentar variaciones en un mayor número de aminoácidos quizás suponga un cambio en el plegamiento o en la conformación de la proteína que le impida interaccionar con proteínas endógenas de la célula. Esta incapacidad para

interaccionar con otras proteínas puede ser la causa de que este mutante no pueda activar la ruta que conduce a la muerte de la célula.

SOK1 es cortada por la caspasa 3. Una vez cortada, da lugar a dos fragmentos que se corresponden con el dominio catalítico (Δ C-SOK1) y el dominio regulador (RD-SOK1), tal como sucede con otras quinasas del grupo de SOK1 y como demuestra el tamaño de SOK1 tras el procesamiento por parte de las caspasas. Los datos obtenidos *in vitro* y que se presentan en este trabajo, se complementan y verifican con los datos que demuestran que SOK1 también se corta *in vivo* en respuesta a anoxia química. En este trabajo, hemos demostrado que la sobreexpresión de ambos dominios por separado, aunque en menor medida en el caso del dominio regulador, induce muerte celular.

Con respecto al dominio regulador, (RD-SOK1) el caso de SOK1 no es el primero en el que se atribuye una función específica a este dominio en una Ste20, aunque sí es la primera vez que se demuestra que la sobreexpresión del dominio regulador provoca muerte celular. En el caso de la proteína de la subfamilia GCK-V de las Ste20, SLK, una vez separado del resto de la proteína tras la proteólisis por parte de las caspasas, el dominio regulador provoca la despolarización de las fibras de estrés de actina (Sabourin et al, 2000). En nuestro caso, únicamente hemos determinado que la sobreexpresión del dominio regulador de SOK1 provoca muerte celular. Sabemos además que este dominio se localiza por toda la célula, incluido el núcleo (comunicación personal de Miguel Fidalgo). Serán necesarios más experimentos para profundizar en el mecanismo a través del cual esta muerte se produce.

Una vez que comprobamos que el dominio regulador puede producir muerte por sí mismo, podemos pensar que en la muerte que inducen los mutantes SOK1^{K49R} y SOK1^{T174A} contribuye este dominio una vez que se separa del resto de la proteína tras el procesamiento de ésta por parte de las caspasas. Siguiendo esta teoría, la incapacidad de inducir muerte del mutante SOK^{4A} podemos adjudicarla al hecho de que las mutaciones alteren el plegamiento de la proteína impidiendo que las caspasas puedan cortarla además de al hecho de que estas alteraciones en la conformación proteica le impidan interaccionar con otras proteínas endógenas de la célula y activar la ruta de muerte.

Tal como hicimos en el caso de SOK1, quisimos determinar la implicación de la actividad quinasa en la muerte inducida por Δ C-SOK1. En este caso, los resultados nos indican que en el caso de Δ C-SOK1 la actividad quinasa sí que es importante para poder

inducir muerte. Ni Δ C-SOK1^{K49R} ni Δ C-SOK1^{T174A} provocan muerte celular cuando se sobreexpresan. Podemos explicar estos resultados atribuyéndolos además de a la pérdida de la actividad quinasa, a la falta del dominio regulador. La pérdida de este dominio puede suponer la pérdida de la capacidad de interacción de Δ C-SOK1 con proteínas endógenas de la célula de forma que no pueda activarse la ruta de muerte. Con respecto al mutante Δ C-SOK1^{4A}, teniendo en cuenta que muestra actividad quinasa detectable, la teoría más lógica para explicar que no pueda inducir muerte es la imposibilidad de entrar en el núcleo de la célula, incluso en células sometidas a estrés (comunicación personal de Miguel Fidalgo). También podemos justificarlo con los mismos razonamientos que en el caso de Δ C-SOK1^{K49R} y Δ C-SOK1^{T174A}, que la pérdida del dominio regulador, o un plegamiento diferente de la proteína debido a las mutaciones impidan la activación de la ruta bioquímica que conduce a la muerte de la célula.

Otra explicación puede basarse en el hecho de que tanto Δ C-SOK1 como los mutantes originados a partir de ella se expresan en menor medida que SOK1. Quizás la incapacidad para inducir muerte esté basada en una cuestión de estequiometría molecular, y sea necesario que los niveles de la proteína sobreexpresada superen una determinada cantidad que permita desplazar o superar la cantidad de moléculas de un hipotético inhibidor que actúe bloqueando los efectos de SOK1. El efecto de este inhibidor sería salvable en la forma con actividad quinasa, quizás por la inactivación de éste por fosforilación, pero no en los mutantes que carecen de ella.

A modo de resumen, podemos decir que nuestros datos demuestran que en el contexto de sobreexpresión de SOK1 la actividad quinasa no es importante para la inducción de muerte celular pero sí que lo es cuando se sobreexpresa Δ C-SOK1. Basándonos en lo que ocurre con otras proteínas, estos datos pueden explicarse suponiendo que la presencia del dominio regulador posibilita la interacción con otras proteínas celulares o la dimerización con la propia SOK1 endógena de manera que puede desencadenarse la ruta apoptótica, o bien que las caspasas cortan a SOK1 y la muerte que se observa con la sobreexpresión de SOK1^{K49R} y SOK1^{T174A} esté inducida por lo menos en parte por el dominio regulador una vez separado del resto de la proteína. Con respecto al mutante en la NLS de SOK1, podemos atribuir la incapacidad para inducir muerte a la incapacidad de ambos para entrar en el núcleo de la célula. Podemos hipotetizar que las mutaciones provocan cambios en el plegamiento de

la proteína que impiden su interacción con proteínas endógenas o impiden el procesamiento por las caspasas.

Teniendo en cuenta la localización de SOK1, su activación y su implicación en procesos relacionados con la viabilidad celular, podemos resumir esquemáticamente su estado en la célula en tres situaciones diferentes. En células no sometidas a estrés, SOK1 se encuentra unida a GM130 y localizada en el aparato de Golgi. Esta es la situación descrita en el trabajo de Preisinger y colaboradores (Preisinger et al, 2004). Nos encontramos una segunda situación en la que SOK1 se activa en respuesta a estrés, concretamente en los primeros estadios de la respuesta a estrés oxidativo (Pombo et al, 1997). Si el estrés persiste, situación que consideramos equivalente a la sobreexpresión de la quinasa, SOK1 se activa y desencadena la ruta de muerte celular. En esta ruta hemos demostrado la implicación de las caspasas, que cortan a SOK1 dando lugar a dos fragmentos correspondientes a Δ C-SOK1 y RD-SOK1. Esta situación, así como la sobreexpresión de los dominios catalítico y regulador por separado conduce a la muerte de la célula (**figura 30**).

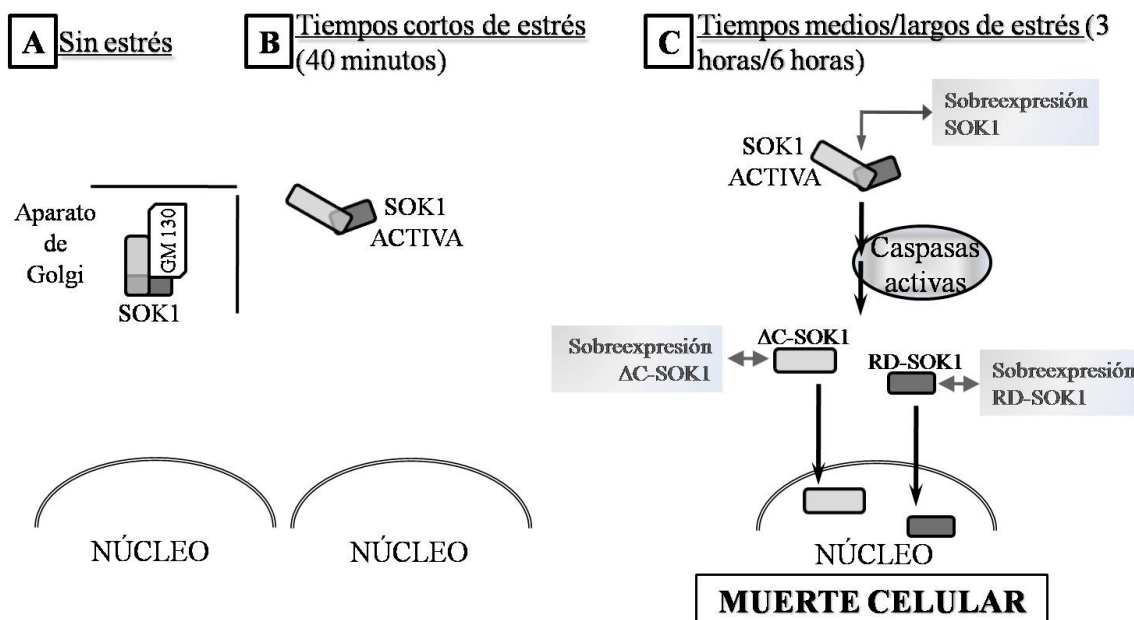


Figura 30.-Representación esquemática que refleja tres posibles estados de SOK1 en la célula dependiendo de si esta se encuentra o no sometida a estrés y del tiempo de duración de éste.

Con respecto los datos de la interacción de SOK1 con la hipotética metiltransferasa SINT-5 son todavía pocas las conclusiones que se pueden sacar en función de los datos que se presentan en este trabajo. Más bien, pueden considerarse como la apertura de nuevas vías en las que seguir trabajando para continuar con la investigación sobre la función de SOK1 en la célula así como de los mecanismos que regulan esta función. En el momento en el que se aisló a SINT-5 por su interacción con SOK1 en un sistema de doble híbrido en levaduras, se consideró interesante y se decidió estudiar esta proteína porque SINT-5 guarda una gran homología con metiltransferasas, concretamente metiltransferasas de ubiquinona. Las metiltransferasas de ubiquinona son enzimas que participan en la síntesis de ubiquinona o coenzima Q (Jonassen et al, 2000). Las funciones que puede desempeñar la ubiquinona en las células son varias. Por un lado, es un componente fundamental de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se localiza en la membrana interna de este orgánulo e interviene en el paso de los electrones entre los complejos I, II, y III. Juega por lo tanto un papel fundamental en la síntesis de ATP en la célula. Fuera de la mitocondria, la ubiquinona actúa gracias a su estructura como un antioxidante liposoluble. En este sentido, su función más importante es evitar la peroxidación de lípidos y proteínas. Además también se ha demostrado que interviene en la estabilidad y fluidez de las membranas. Se ha comprobado que también está implicado en dar mayor fluidez a la sangre y facilitar el flujo sanguíneo a través del músculo cardíaco en personas con enfermedades relacionadas con isquemia cardíaca (revisado por Betingier et al, 2007).

En este trabajo, confirmamos que SOK1 y SINT-5 sobreexpresados interaccionan en células de mamífero, concretamente, SINT-5 interacciona con el dominio catalítico de SOK1. Además hemos comprobado que SINT-5 reduce la actividad quinasa de SOK1, y que su sobreexpresión induce una modificación postraduccional en SOK1. Esta modificación es dependiente del dominio metiltransferasa, y retarda su movilidad en geles de poliacrilamida. Existe la posibilidad de que esta modificación sea una metilación de SOK1. Este es un dato que todavía hay que confirmar y además hay de determinar su significado. La metilación como modificación postraduccional de proteínas es un proceso cuya existencia se conoce desde la década de los años 60, sin embargo su estudio se considera un fenómeno reciente. Las proteínas pueden metilarse en residuos de lisina o arginina. La metilación en residuos de arginina suele estar mediada por los miembros de la familia PRMT

(*protein arginine N-methyltransferases*). La metilación en residuos de lisina es la que tiene lugar en las histonas, siendo más numerosos los trabajos publicados sobre este tipo de metilación. Aunque se ha descrito y caracterizado la función de la metilación de diferentes proteínas, se conoce muy poco acerca de la metilación de quinasas (revisado por Paik et al, 2007).

En cuanto a la regulación de las funciones biológicas de SOK1, nuestros experimentos indican que la sobreexpresión de SINT-5 reduce la muerte inducida por SOK1 de manera dependiente de su dominio metiltransferasa, ya que esta reducción no se observa con el mutante SINT-5^{RVR}. Este resultado puede atribuirse al hecho de que SINT-5 reduce la actividad quinasa de SOK1.

Aunque se ha verificado la interacción entre SINT-5 y SOK1, queda por determinar la mayor parte del significado de esta interacción. Habría que confirmar si SINT-5 es realmente una metiltransferasa de ubiquinona, y si participa en su síntesis. En este caso, teniendo en cuenta que la ubiquinona está implicada en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y que además puede actuar como antioxidante liposoluble, quizás sean hechos relacionados que SOK1 interaccione con una proteína que a su vez puede estar relacionada con el mantenimiento del potencial de oxido-reducción de la célula controlando la generación de ROS en la mitocondria gracias a la síntesis de ubiquinona o coenzima Q.

Sin embargo, además de en la membrana de las mitocondrias, se ha descrito la existencia de ubiquinona en casi todas las membranas de la célula y también en el aparato de Golgi. De hecho, las vesículas del aparato de Golgi poseen la mayor concentración de ubiquinona o coenzima Q de todas las membranas celulares (revisado por Betingier et al, 2007). Hay estudios que demuestran que la síntesis de ubiquinona tiene lugar en las vesículas existentes entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, y que esta síntesis termina en la membrana externa de trans-Golgi. Lugar donde se localiza SOK1 en células no sometidas a estrés (Preisinger et al, 2004). Desde el aparato de Golgi, estos lípidos se distribuyen al resto de membranas celulares (Kalén et al, 1990). Como ya se ha mencionado, además de su implicación en la cadena de transporte electrónico, también se ha relacionado a la ubiquinona con la participación en el mantenimiento del potencial de oxido-reducción gracias a su capacidad de actuar como antioxidante liposoluble y controlar por lo tanto la concentración de radicales

libres (revisado por Beteringer et al, 2007). No debemos olvidarnos, que es esta concentración de radicales libres existente en la célula el aspecto que controla la activación de SOK1. Quizás no sea un hecho casual que SINT-5 sea similar a metiltransferasas que participan en la síntesis de ubiquinona, y que esta síntesis termine en las membranas externas de trans-Golgi, lugar donde se localiza SOK1. Teniendo en cuenta toda esta información, podemos pensar que existe una relación entre las ubiquinonas y SOK1. Las primeras se sintetizan en el aparato de Golgi e intervienen en el control de la concentración de radicales libres, mientras que la segunda, se localiza en el mismo orgánulo y se activa en respuesta a estrés oxidativo. Quizás el nexo de unión entre las ubiquinonas y SOK1 sea SINT-5, sin embargo, serán necesarios más experimentos para determinar si esta relación existe realmente, sus detalles y su significado biológico.

Tratando de hacer una visión global, en este trabajo se demuestra que SOK1 posee un papel fisiológico relacionado con la apoptosis en respuesta a estrés celular. Por otra parte, se dejan abiertas vías de estudio para continuar tratando de entender la función de SOK1 en la célula así como los mecanismos que regulan esta función. Teniendo en cuenta que la activación de SOK1 se produce como consecuencia del estrés oxidativo, característica común en numerosas patologías de gran relevancia clínica actual, los datos presentados en este trabajo y los que aún faltan por conocer acerca de la biología de esta quinasa, pueden ayudar a entender con mayor detalle las bases moleculares de todos estos procesos patológicos en los que el estrés oxidativo está implicado, lo que contribuirá a que pueda aportarse una mejor solución para ellos.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de SOK1 provoca muerte en diferentes líneas celulares. Esta muerte presenta características morfológicas y bioquímicas típicas de la muerte celular por apoptosis.
2. La inhibición de los niveles de SOK1 en la línea celular HEK293 protege a éstas de la apoptosis en respuesta a anoxia química.
3. SOK1 se activa en respuesta a tiempos medios/largos de estrés osmótico en la línea celular HEK293 a través de la formación de ROS. La reducción de los niveles de la quinasa en esta línea celular aumenta la supervivencia de las células frente a este tipo de estrés.
4. SOK1 es un sustrato de la caspasa 3 y es cortada por ésta *in vitro*.
5. La muerte celular inducida por SOK1 se produce tanto con la sobreexpresión de la proteína completa, con la sobreexpresión del dominio catalítico N-terminal (Δ C-SOK1), y, aunque en menor medida, también con la de la sobreexpresión del dominio regulador C-terminal (RD-SOK1).
6. La actividad quinasa de SOK1 no es imprescindible para la inducción de muerte celular cuando se sobreexpresa la proteína completa, pero sí cuando se sobreexpresa el dominio catalítico de ésta (Δ C-SOK1).
7. Para la inducción de muerte celular tanto por parte de SOK1 como por parte de Δ C-SOK1 es necesario que esté intacta la secuencia localizada entre los aminoácidos 275-291, homóloga a la secuencia de localización nuclear de Mst3.
8. SOK1 interacciona en células de mamífero con la hipotética metiltransferasa SINT-5 (Mettl2a) a través de su dominio catalítico. Las consecuencias de esta interacción demostradas en este trabajo son:

- 8.1 SINT-5 reduce la actividad quinasa tanto basal como estimulada con peróxido de hidrógeno de SOK1.
- 8.2 Cuando se sobreexpresa SINT-5, pero no SINT-5^{RVR}, se observa un retardo en la migración de SOK1 en geles de poliacrilamida.
- 8.3 SINT-5, pero no SINT-5^{RVR}, reduce la muerte celular inducida por SOK1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M. S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., & Minden, A. (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* 17:6527-6540.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Davis, R.J., & Ronai Z. (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18: 1321–1334.
- Ahn, S. H., Cheung, W.L., Hsu, J. Y., Diaz, R. L., Smith, M. M., & Allis, C. D. (2005). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell.* 120: 25-36.
- Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z., & Kim, H. Y. (2005). Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:10858–10863.
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* 5: S18–S25.
- Antonsson, B., & Martinou, J-C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 256:50-57.
- Arnold, R., Frey, C.R., Müller, W., Brenner, D., Krammer, P.H., and Tiefer, F. (2007) Sustained JNK signaling by proteolytically processed HPK1 mediates IL-3 independent survival during monocytic differentiation. *Cell Death Differ.* 14:568-75.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6161–6165.
- Bahler, M. (2000) Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim. Biophys. Acta* 1496: 52–59.
- Barford, D., Jia, Z., & Tonks, N. K. (1995). Protein tyrosine phosphatases take off. *Nat. Struct. Biol.* 2: 1043–1053.
- Barnett, Y. A., & King, C. M. (1995). Investigation of antioxidant status. DNA-repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mut. Res.* 338:115-128.
- Bauer, C. E., Elsen, S., & Bird T. H. (1999). Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 495–523.
- Behrend, L., Henderson, G., & Zwacka, R. M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1441–1444.
- Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion.* 7S: S41-S50.

Bivona, T.G., Perez De Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V-K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D., & Philips, M.R. (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*. 424:694-698.

Borner, C., & Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Diff.* 6:497-507.

Boscoboinik, D., Szewczyk, A., Hensey, & C., Azzi, A. (1991). Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266:6188–6194.

Brownlee, M., & Cerami, A. (1981). The biochemistry of the complications of diabetes-mellitus. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 385–432.

Burdon, R. H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol.* 18:775–94.

Cadenas, E., & Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222–230.

Cai, J. Y., & Jones, D. P. (1998). Communication – superoxide in apoptosis – mitochondrial generation triggered by Cytochrome *c* loss. *J. Biol. Chem.*, 273, 11401–11404.

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407: 249–257.

Castillo, E. A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., Jones, N. & Hidalgo, E. (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol. Microbiol.* 45: 243-254.

Chapple, I. L. C. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 24, 287–296.

Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., & Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol.* 9:967-970.

Chen, Y. R., Meyer, C. F., Ahmed, B., Yao, Z., & Tan, T. H. (1999). Caspase-mediated cleavage and functional changes of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1). *Oncogene* 18:7370-7377.

Chen, Z. Y., Siu, B., Ho, Y. S., Vincent, R., Chua, C. C., Hamdy, R. C., et al. (1998). Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:2281-2289.

Chen, Z., Gundimeda, U., & Gopalakrishna, R. (1996). Curcumin irreversibly inactivates protein kinase C activity and phorbol ester binding: its possible role in cancer chemoprevention. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 37:1925-1922.

- Cheung, W. L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C. A., Beeser, A., Etkin, L. D., Chernoff, J., Earnshaw, W. C., & Allis, C. D. (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*. 113:507-517.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L., Cox, A.D., & Philips, M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4:343-350.
- Chow, C. W., Rincón, M., Cavanagh, J., Dickens, M., & Davis, R. J. (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278: 1638–164.
- Chow, C.W., Dong, C., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2000). c-Jun NH2 terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5227–5234.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., & Ames, B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753–762.
- Clerk, A., Michael, A. & Sugden P. H. (1998). Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, Hsp25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem. J.* 333: 581-589.
- Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689–691.
- Creasy, C. L. & Chernoff, J. (1995). Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *J. Biol. Chem.* 270:21695-21700.
- Dan, I., Ong, S. E., Watanabe, N. M., Blagoev, B., Nielsen, M. M., Kajikawa, E., Kristiansen, T. Z., Mann, M., & Pandey, A. (2002). Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *J. Biol. Chem.* 277:5929-5939.
- Dan, I., Watanabe, N. M. & Kusumi A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.* 11:220-230.
- De Corte, V., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J., & Gettemans, J. (2002). Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling. *EMBO J.* 21:6781-6790.
- Demple, B., & Halbrook, J. (1983). Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 304: 466–468.
- Dempsey, E. C., Newton, A. C., Mochly-Rosen, D., Fields, A. P., Reyland, M. E., Insel, P. A., et al. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L429–L438.

Deng, Y., Pang, A., & Wang, J. H. (2003). Regulation of mammalian STE20-like kinase 2 (MST2) by protein phosphorylation/dephosphorylation and proteolysis. *J. Biol. Chem.* 278:11760-11767.

Diener, K., Wang, X.S., Chen, C., Meyer, C. F., Keesler, F., Zukowski, M., Tan, T. H., & Yao, Z. (1997). Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:9687-9692.

Dikalov, S. I., Vitek, M. P., & Mason, R. P. (2004). Cupric-amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 340–347.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47–95.

Drogen, F., O'Rourke, S. M., Stucke, V. M., Jaquenoud, M., Neiman, A. M., & Peter, M. (2000). Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr. Biol.* 10:630-639.

English, J. M., Vanderbilt, CA., Xu, X., Marcus, S., & Cobb, M. H. (1995). Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* 270: 28897–28902.

Evens, A. M. (2004). Motexafin gadolinium: A redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 16, 576–580.

Fedtke, N., Boucheron, J. A., Walker, V. E., & Swenberg, J. A. (1990). Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and n2,3-ethenoguanine in rat-tissue DNA. *Carcinogenesis* 11: 1287–1292.

Fink, S. P., Reddy, G. R., & Marnett, L. J. (1997). Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 8652–8657.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1: 27–31.

Fossel, M. (2003). *Cells, Aging and Human Disease*. New York: Oxford University Press.

Fu, C. A., Shen, M. Huang, B. C., Lasaga, J., Payan, G., & Luo, Y. (1999). TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274:30729-30737.

Fujino, G., Noguchi T., Takeda K., & Ichijo H. (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Seminars in Cancer Biology* 16: 427–435.

Galis, Z. S., & Khatri, J. J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis—The good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 90: 251–262.

- Gerschman R, Nye SW, Gilbert DL, Dwyer P, Fenn WO. (1954) Studies on oxygen poisoning: protective effect of beta-mercaptoethylamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85:75-7.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation. A mechanism in common. *Science* 119: 623–626.
- Gershenovich ZS, Krichevskaya AA. (1960) The protective role of arginine in oxygen poisoning. *Biokhimiia* 25:790-5.
- Glantschnig, H., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2002). Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277:42987-42996.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., & Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 22480–22489.
- Gopalakrishna, R., & Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1349–1361.
- Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., & Chen, Z. (1997). Cancer preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in calcium-dependent isoenzymes of protein kinase C. *Arch. Biochem. Biophys.* 348:25–36.
- Graves, J. D., Draves, K. E., Gotoh, Y., Krebs, E. G. & Clark, E. A. (2001). Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:14909-14915.
- Graves, J. D., Gotoh, Y., Draves, K. E., Ambrose, D., Han, D. K., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E. A., & Krebs, E. G. (1998). Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J.* 17:2224-2234.
- Green, D., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-1312.
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. A. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 271: 15504–15509.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576-596.

Harada, N., Hatano, E., Koizumi, N., Nitta, T., Yoshida, M., Yamamoto, N., Brenner, D. A., & Yamaoka, Y. (2004). Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 121: 159–170.

Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298–300.

Hassan, H. M. & Fridovich I. (1977). Regulation of the synthesis of superoxidedismutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252: 7667–7672.

Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H., & Takeda, K. (2000) Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J. Biol. Chem.* 275: 26576–26581

Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-776.

Hideaki Takeya, H., Onose, R., & Osada, H. (1998). Caspase-mediated activation of a 36-kDa myelin basic protein kinase during anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer research.* 58: 4888-4894.

Hidalgo, E., Bollinger, J. M., Bradley, T. M., Walsh, C. T., & Dimple, B. (1995). Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J. Biol. Chem.* 270: 20908–20914.

Hu, M. C., Qiu, R. W., Wang, X., Meyer, C. F., & Tan, T. H. (1996). Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev.* 10:2251-2264.

Huang, C. Y., Wu, Y. M., Hsu, C. Y., Lee, W. S., Lai, M. D., Lu, T. J., Huang, L., Leu, T. H., Shih, H. M., Fang, H. I., Robinson, D. R., Kung, H. J., & Yuan, C. J. (2002). Caspase activation of mammalian sterile 20-like kinase 3 (Mst3). Nuclear translocation and induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:34367-34374.

Hui, L., Pei, D. S., Zhang, Q. G., Guan, Q. H., & Zhang, G.Y. (2005). The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation. *Brain Res.* 1052:1–9.

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P. ten., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275: 90-94.

Jin, L., & Yang, H. (2006). Alpha-Synuclein aggregation and Parkinson's disease: Factors affecting the aggregation of alpha-synuclein. *Prog. Biochem. Biophys.* 33: 321 328.

Jonassen, T., and Clarke, C.F. (2000). Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275: 12381-7.

- Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J. Y., Lynn, M. J., & Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 625–635.
- Jones, S. P., Hoffmeyer, M. R., Sharp, B. R., Ho, Y. S., & Lefer, D. J. (2003). Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivomyocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H277-H282.
- Kagan, R. M., & Clarke S. (1994). Widespread Occurrence of Three Sequence Motifs in Diverse S-Adenosylmethionene-Dependent Methyltransferases Suggest a Common Structure for These Enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 310: 417-427.
- Kakhlon, O., & Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1037-1046.
- Kalén, A., Appelkvist, E. L., Chojnacki, T., & Dallner, G. (1990). Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate Transferase, an Enzyme Involved in Ubiquinone Biosynthesis, in the Endoplasmic Reticulum-Golgi System of Rat Liver.. *The Journal of Biological Chemistry.* 265: 1158-1164.
- Kandel, E. S., & Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell. Res.* 253:210–229.
- Kasparova, S., Brezova, V., Valko, M., Horecky, J., Mlynarik, V., Liptaj, T., et al. (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem. Int.* 46: 601–611.
- Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., et al. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and γ irradiation. *J Immunol.* 161: 3936-3942.
- Katz, P., Whalen, G., & Kehrl, J. H. (1994). Differential expression of a novel protein kinase in human B lymphocytes. Preferential localization in the germinal center. *J. Biol. Chem.* 269:16802-16809.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. O., Boonplueang, R., et al. (2003). Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: A novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron.* 37: 899–909.
- Ke, N., & Godzik, A., & Reed, J. C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem.* 276: 12481-12484.
- Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell.* 120: 449-460.
- Kiefer, F., Tibbles, L. A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B. W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J. R., & Iscove, N. N. (1996). HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J.* 15:7013-7025.

Kitanaka, C., & Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 6:508-515.

Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., & Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* 15: 5314–5325.

Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* (2000). 407:789-795.

Kuge, S., & Jones, N. (1994) YAP-1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13: 655–664.

Kuge, S., Jones, N., & Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16: 1710–1720.

Kukreja, R. C., & Hess, M. L. (1992). The oxygen free-radical system: From equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.* 26: 641–655.

Kyriakis, J. M. (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 274:5259-5262.

Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81:807–69.

Lazou, A., Bogoyevitch, M. A., Clerk, A., Fuller, S. J., Marshall, C. J., & Sugden, P. H. (1994). Regulation of mitogen-activated protein kinase cas-cade in adult rat heart preparations in vitro. *Circ. Res.* 75: 932–941.

Leberer, E., Dignard, D., Marcus, D., Thomas, D. Y., & Whiteway, M. (1992). The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* 11:4815-4824.

Lee, K. K. & Yonehara, S. (2002). Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST). *J. Biol. Chem.* 277:12351-12358.

Lee, K. K., Murakawa, M., Nishida, E., Tsubuki, S., Kawashima, S., Sakamaki, K., & Yonehara, S. (1998). Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. *Oncogene.* 16:3029-3037.

Lee, W. S., Hsu, C. Y., Wang, P. L., Huang, C. Y., Chang, C. H., & Yuan, C. J. (2004). Identification and characterization of the nuclear import and export signals of the mammalian Ste20-like protein kinase 3. *FEBS Lett.* 572:41-45.

Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B. E., DoBacco, S., Iglesia, N. de la., Gygi, S., Blackwell, T. K., & Bonni, A. (2006). A conserved MST-

FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*. 125: 987-1001.

Leonard, S. S., Harris, G. K., & Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1921–1942.

Li, X. L., Man, K., Ng, K. T., Sun, C. K., Lo, C. M., & Fan, S. T. (2005). The influence of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on the ischemic injury during rat liver graft preservation. *Am. J. Transpl.* 5:1264–1275

Lin, J. L., Chen, H. C., Fang, H. I., Robinson, D., Kung, H. J., & Shih, H. M. (2001). MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. *Oncogene* 20:6559–6569.

Lin, Y., Khokhlatchev, A., Figeys, D., & Avruch, J. (2002). Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:47991–48001.

Liochev, S. I., & Fridovich, I. (2002). The Haber–Weiss cycle 70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 7: 55–57.

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kyriakis, J. M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell Biol.* 20:2198–208.

Lopez-Neblina, F., & Toledo-Pereyra, L. H. (2006). Phosphoregulation of signal transduction pathways in ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 134: 292–299.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., & Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367:40–46.

Mao, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., & Stone, M. P. (1999). Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6615–6620.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation: DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res-Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 424: 83–95.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16: 577–586.

Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K., & Ichijo, H. (2002). Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid. Redox Sign.* 4:415–25.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244: 6049–6055.

Melzig, J., Rein, K. R., Schafer, U., Pfister, H., Jackle, H., Heisenberg, M., & Raabe, T. (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the *Drosophila* adult central nervous system. *Curr. Biol.* 8:1223-1226.

Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 95–108.

Miller, T. M., Moulder, K. L., Knudson, C. M., et al. (1997). Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase independent pathway to cell death. *J Cell Biol.* 139:205-217.

Mittal, C. K., & Murad, F. (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical—Physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4360–4364.

Molavi, B., & Mehta, J. L. (2004). Oxidative stress in cardiovascular disease: Molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr. Opin. Cardiol.* 19: 488–493.

Moore, T. M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M. J., Ridley, A. J., & Morris, J.D. (2000). PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* 275:4311-4322.

Morgan, B. A., Banks, G.R., Toone, W.M., Rait, D., Kuge, S., & Johnston, L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16: 1035–1044.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H., & Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* 20: 6028–6036.

Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and MAPKs in TGF beta signaling. *Cytokine Growth Fact. Rev.* 11: 23–35.

Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 49064–49073.

Mullonkal, C. J., and Toledo-Pereyra, L. H. (2007). Akt in Ischemia and Reperfusion. *Journal of Investigative Surgery.* 20: 195-203.

Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K., & Yodoi, J. (1994). Adult T cell leukemia derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol. Lett.* 42: 75–80.

Nakamura, H., Nakamura, K., & Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 351–369.

- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13: 9–22.
- Nicke, B., Bastien, J., Khanna, S. J., Warne, P. H., Cowling, V., Cook, S. J., Peters, G., Delpuech, O., Schulze, A., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R. L., Bernards, R., and Granesan, T. S. (2005). Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell.* 20:673–85.
- Niedowicz, D. M., & Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell. Biochem. Biophys.* 43: 289–330.
- Nishikawa T., & Araki E. (2007). Impact of Mitochondrial ROS Production in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Antioxidants & Redox Signaling.* 9: 343–353.
- Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104: 6255–6285.
- O'Reilly, P. G., Wagner, S., Franks, J. D., Cailliau, K., Browaeys, E., Dossous, C., & Saubourin, L. A. (2005). The Ste20 like kinase SLK is required for cell cycle progression through G₂. *J. Biol. Chem.* 280: 42383–42390.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., & Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306:2267–2270.
- Osada, S., Izawa, M., Saito, R., Mizuno, K., Suzuki, A., Hirai, S., & Ohno, S. (1997). YSK1, a novel mammalian protein kinase structurally related to Ste20 and SPS1, but is not involved in the known MAPK pathways. *Oncogene.* 14:2047–2057.
- Ozben, T. (2007). Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 96: 2181–2106.
- Paez, J. G., & Sellers, W. R. (2003). PI3K/PTEN/AKT pathway: A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat. Res.* 115:145–167.
- Paik, W. K., Paik D. C., & Kim, S. (2007). Historical review: the field of protein Methylation. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 32: 146–152.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.* 304: 55–68.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 333: 19–39.
- Peng, J., & Andersen, J. K. (2003). The role of c-jun N-terminal kinase JNK in Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 55: 267–271.

Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., & Chiarotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.* 11: 1163–1182.

Pombo, C. M., Bonventre, J. V., Molnar, A., Kyriakis, J., & Force, T. (1996). Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *EMBO J.* 15:4537-4546.

Pombo, C. M., Force, T., Kyriakis, J., Nogueira, E., Fidalgo, M., & Zalvide, J. (1997). The GCK II and III subfamilies of the STE20 group kinases. *Frontiers in Bioscience*.

Pombo, C. M., Tsujita, T., Kyriakis, J. M., Bonventre, J. V., & Force, T. (1997). Activation of the Ste20-like oxidant stress response kinase-1 during the initial stages of chemical anoxia-induced necrotic cell death. Requirement for dual inputs of oxidant stress and increased cytosolic $[Ca^{2+}]$. *J. Biol. Chem.* 272:29372-29379.

Preisinger, C., Short, B., Bruyneel, C. De, V. E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., & Barr, F. A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J. Cell Biol.* 164:1009-1020.

Qian, Z., Lin, C., Espinosa, R., LeBeau, M., & Rosner, M. R. (2001). Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase. *J. Biol. Chem.* 276:22439-22445.

Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in beta-cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 52:581–587.

Roy, P., & Saha, A. (2002). Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Curr. Sci.* 82: 38–45.

Rudel, T., & Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-1574.

Sabourin, L. A., & Rudnicki, M. A. (1999). Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase. *Oncogene* 18:7566-7575.

Sabourin, L. A., Tamai, K., Seale, P., Wagner, J., & Rudnicki, M. A. (2000). Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. *Mol. Cell Biol.* 20:684-696.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., et al. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17:2596–606.

Salmeen, A., & Barford, D. (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antiox. Redox. Signal.* 7: 560–577.

Saretzki, G., Petersen, S., Petersen, I., Kolble, K., & von Zglinicki, T. (2002). hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 176:81-91.

- Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., Ichijo, H. & Hashimoto, K. (2001). Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276: 999-1004.
- Sayre, L. M., Smith, M. A., & Perry, G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8: 721–738.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1191–1212.
- Scheel, H. & Hofmann, K. (2003). A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Curr. Biol.* 13:899-900.
- Schinkmann, K. & Blenis, J. (1997). Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual cofactor requirements. *J. Biol. Chem.* 272:28695-28703.
- Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C., & Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20:453-461.
- Shui, J. W., Boomer, J. S., Han, J., Shu, J., Dement, G. A., Zhou, G. and Tan, T. H. (2007). Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol.* 8:84-91.
- Siems, W. G., Grune, T., & Esterbauer, H. (1995). 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sci.* 57: 785–789.
- Stadtman, E. R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11: 1105–1112.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., & Ames BN. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248: 189–194.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 10: 1881–1896.
- Su, Y. C., Han, J., Xu, S., Cobb, M., & Skolnik, E. Y. (1997). NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* 16:1279-1290.
- Sulciner DJ, Irani K, Yu ZX, Ferrans VJ, Goldschmidt-Clermont P, & Finkel T. Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NFκB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16:7115–7121.
- Sun, H., King, A. J., Diaz, H. B., & Marshall, M. S. (2000). Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr. Biol.* 10:281-284.

- Sun, T., & Oberley, L. W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 335–348.
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Sulciner, D. J., Gutkind, J. S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont P. J., and Finkel T. (1996). Regulation of reactive-oxygenspecies generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* 318: 379–382.
- Sung, V., Luo, W., Qian, D., Lee, I., Jallal, B., & Gishizky, M. (2003). The Ste20 kinase MST4 plays a role in prostate cancer progression. *Cancer Res.* 63:3356-3363.
- Taylor, L. K., Wang, H. C., & Erikson, R. L. (1996). Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10099-10104.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: 1005–L1028.
- Tobiume, K., Inage, T., takeda, K., Enomoto, S., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1997). Molecular cloning and characterization of the mouse apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:905-910.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., et al. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2:222–8.
- Tobiume, K., Saitoh, M., & Ichijo, H. (2002). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell Physiol.* 191:95–104.
- Tsaneva, I. R., & Weiss, B.(1990) soxR, a locus governing a superoxideresponse regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 4197–4205.
- Ura, S., Masuyama, M., Graves, J. D., & Gotoh, Y. (2001). Mst1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes cells.* 6: 519-530.
- Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. D., & Gotoh, Y. (2001). Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:10148-10153.
- Valco, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., & Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266: 37–56.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161–1208.

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1–40.
- Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., and Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380:297-309.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2:489–501.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B., & Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:8875-8880.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol. Microbiol.* 52:1427-1435.
- Voehringer, D. W., Hirschberg, D. L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C. B., et al. (2000). Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 2680–2685.
- Wang, M. Y., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., deAndrade, M., & Li, D. H. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* 5: 705–710.
- Wang, X. S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T. H., Lichenstein, H., Zukowski, M., & Yao, Z. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 31607–31611.
- Wang, X., & RON, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* 272: 1347–1349.
- Wes, P. D., Xu X.-Z. S., Li X.-S., Chien F., Doberstein S. K., & Montell, C. (1999) Termination of phototransduction requires binding of NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nat. Neurosci.* 2: 447–453.
- Westermarck, J., & Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in turner invasion. *FASEB J.* 13: 781–792.
- Whisler, R. L., Goyette, M.A., Grants, I. S., & Newhouse, Y. G. (1995). Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/ threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 23–35.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79:143–80.

Wilmer, W. A., Tan, L.C., Dickerson, J. A., Danne, M., & Rovin, B. H. (1997). Interleukin-1 β induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J. Biol. Chem.* 272: 10877–10881.

Wu, C., Whiteway, M., Thomas, D. Y., & Leberer, E. (1995). Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270:15984-15992.

Wu, H. Y., Lin, C. Y., Lin, T. Y., Chen, T. C., Yuan, C. J. (2007). Mammalian Ste20-like kinase 3 mediates trophoblast apoptosis in spontaneous delivery. *Apoptosis*. On line DOI 10.1007/s10495-007-0161-x

Xiang, J., Chao, D. T., & Korsmeyer, S. J. (1996). Bax-induced cell death may not require interleukin 1-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14559-14563.

Yashpe-Purer Henis, Y., & Yashpe J. (1977). Regulation of catalase level in *Escherichia coli* K12. *J. Microbiol.* 23: 84–91.

Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J. H., & Kyriakis, J. M. (1998). Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.* 273:22681-22692.

Zheng, M., Åslund, F., & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718–1721.

Zhou, G., Bao, Z. Q., & Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 12665–12669.

Zhou, T. H., Ling, K., Guo, J., Zhou, H., Wu, Y. L., Jing, Q., Ma, L., & Pei, G. (2000). Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275:2513-2519.

Zong, W. X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20: 1-15.



Universidade de Santiago de Compostela
Facultade de Medicina
Departamento de Fisioloxía